

**Untersuchungen zur Funktion des Heparansulfat-Proteoglykans  
Syndecan bei gerichteten Migrationsprozessen in den Muskeln und  
im Nervensystem  
von *Drosophila melanogaster***

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Patrick Steigemann  
aus Lüneburg

1. Referent:	Prof. Dr. H.-H. Arnold
2. Referent:	Prof. Dr. H. Jäckle
eingereicht am:	31.01.2005
mündliche Prüfung (Disputation) am:	15.06.2005
	2005
	(Druckjahr)



## **VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jäckle, H., und Vorbrüggen, G. 2004.  
Heparan Sulfate Proteoglycan Syndecan Promotes Axonal and Myotube Guidance by Slit/Robo Signaling. *Curr Biol.* 14:225-30.

### **Tagungsbeiträge**

Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jäckle, H., und Vorbrüggen, G. (2002).  
Syndecan, a Heparan Sulfate Proteoglycan involved in Myogenesis in *Drosophila melanogaster*. (Posterpräsentation). *EMBO Workshop on the Molecular Genetics of Myogenesis and Muscle Diseases*. Cambridge, England

Steigemann, P., Molitor, A., Fellert, S., Jäckle, H., und Vorbrüggen, G. (2003). The Heparan Sulfate Proteoglycan Syndecan is Important for Slit/Robo Signaling. (Posterpräsentation). *18th European Drosophila Research Conference*. Göttingen, Deutschland

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Jäckle, in der Arbeitsgruppe von Dr. Gerd Vorbrüggen, durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gerd Vorbrüggen für die Überlassung und engagierte Betreuung des Projekts, seine stete Diskussionsbereitschaft und für seine intellektuellen wie praktischen Beiträge zu diesem Projekt.

Prof. Dr. Herbert Jäckle danke ich für sein Interesse und die großzügige Unterstützung sowie für Motivation in schwierigen Phasen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Henning Arnold für die Vertretung dieser Arbeit an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Für die freundliche Überlassung von Materialien und Informationen danke ich Stefan Baumgartner, Ho Ryun Chun, Barry Dickson, Alf Herzig, Christian Klämbt, Xinhua Lin, Christos Samakovlis, Ulrich Schäfer, Stephan Sigrist und Aaron Voigt.

Für hilfreiche Vorschläge, Diskussionen und Unterstützung danke ich Stephen Blanke, Bhavna Chanana, Sonja Fellert, Sebastian Grönke und Gerd Vorbrüggen.

Danke an Gordon Dowe, Sonja Fellert und Uschi Jahns-Meyer für die technische Unterstützung.

Der ganzen Abteilung, vor allem Labor 5 und insbesondere Stephen Blanke, Sonja Fellert und Sebastian Grönke möchte ich für die schöne Zeit in der Abteilung danken.

# **INHALTSVERZEICHNIS**

## **ABKÜRZUNGEN** **III**

## **1 EINLEITUNG** **1**

1.1	Die Ausbildung des somatischen Muskelsystems im <i>Drosophila</i> -Embryo	3
1.2	Gerichtetes Wachstum der Muskelvorläuferzellen	7
1.3	Identifikation neuer Faktoren, die am gerichteten Wachstum von Muskelvorläufern beteiligt sind	9

## **2 ERGEBNISSE** **14**

2.1	Erzeugung von <i>sdc</i> -mutanten Allelen	14
2.1.1	<i>sdc</i> -Mutanten zeigen Defekte im Muskelmuster und im Zentralen Nervensystem	17
2.2	Sdc als möglicher Spieler im Slit/Robo-Signaltransduktionsweg	21
2.2.1	Kolokalisierung von Sdc und Robo auf den Axonen der Nervenzellen und an den Apodemen	21
2.2.2	Genetische Interaktion von <i>sdc</i> mit <i>slit</i> - und <i>robo</i> -Allelen	24
2.3	<i>sdc</i> , <i>robo</i> - und <i>sdc</i> , <i>robo2</i> -Doppelmutanten	27
2.3.1	Funktionen von Sdc im Tracheensystem	28
2.4	Gewebespezifische Normalisierungsexperimente	30
2.5	Die Sdc-Proteinfamilie bei Vertebraten und Invertebraten zeigt einen hohen Grad an Konservierung in ihrer carboxyterminalen Region	34
2.5.1	Sdc-Deletionsproteine	35
2.5.2	Subzelluläre Lokalisierung der Sdc-Deletionsproteine	38
2.6	Spezifität von Sdc in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg	39

## **3 DISKUSSION:** **45**

3.1	Die erzeugten <i>sdc</i> -Allele stellen starke hypomorphe oder amorphe Allele dar	45
3.2	Sdc ist eine Komponente des Slit/Robo-Signalwegs	47
3.3	Die Effizienz des Slit-Signals ist abhängig von Sdc	48
3.4	Robo- und Robo2-Rezeptorfunktionen sind Sdc-abhängig	51
3.5	Molekulare Rolle von Sdc bei der Vermittlung des Slit-Signals	52
3.6	Die cytoplasmatische Region von Sdc ist nicht essentiell für die Funktion des Slit/Robo-Signalwegs	55
3.7	Spezifität von Sdc im Slit/Robo-Signalweg	58

<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>61</b>
4.1.1	Präparierung von Plasmid-DNA	61
4.1.2	Schnelle Präparierung kleiner Mengen genomischer DNA für die PCR	61
4.1.3	Präparierung größerer Mengen genomischer DNA	61
4.1.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	62
4.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	62
4.1.6	DNA-Sequenzierung	66
4.1.7	Herstellung rekombinanter Plasmide für Keimbahntransformationen	66
4.1.8	Herstellung von „antisense“-RNA-Sonden	67
<b>4.2</b>	<b>Embryologie und Histologie</b>	<b>68</b>
4.2.1	Fixieren von Embryonen für Antikörperfärbungen und RNA <i>in situ</i> -Hybridisierungen	68
4.2.2	Antikörperfärbungen von Embryonen	68
4.2.3	Herstellung eines Antikörpers gegen Sdc	70
4.2.4	RNA <i>in situ</i> -Hybridisierung an Embryonen	70
4.2.5	Doppel-floureszente RNA <i>in situ</i> -Hybridisierung	71
4.2.6	Keimbahntransformation	71
<b>4.3</b>	<b>Genetik</b>	<b>72</b>
4.3.1	Erzeugung von Allelen über ungenaue Exzision eines P-Elements	74
4.3.2	Ektopische Expression von Transgenen mit dem <i>GAL4/UAS</i> -System	74
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>91</b>

# Abkürzungen

## Allgemeine Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
□2-3	stabil in das Genom integrierte Transposasequelle
DAB	Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin
d.h.	das heißt
Dlp	Dally-like
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
Dpp	Decapentaplegic
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(b-aminoethylether)-N-N-N'-N'-tetraessigsäure
EST	"expressed sequence tag"
FasII	Fasciclin II
et al.	et aliter
Hh	Hedgehog
HSGAG	Heparansulfat-Glykosaminoglykan
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
kbp	Kilobasenpaare
m	Milli-
n	Anzahl
NBT	Nitroblautetrazoliumsalz
nm	Nanometer
μ	Mikro-

M	Molar
P-Element	Transposonelement
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sdc	Syndecan
SDS	Natriumdodecylphosphat
Sfl	Sulfateless
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-aminomethan)
UAS	"Upstream Activation Sequence"
VGZ	Ventrale ganglionische Zweige des Tracheensystems
Wg	Wingless
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius

# 1 Einleitung

Die tierische Zelle wird von einer Plasmamembran umschlossen, einer Lipiddoppelschicht, welche die Grenzen zwischen dem Zytosol und der extrazellulären Umgebung definiert. Diese Membran verhindert die freie Diffusion hydrophiler Moleküle und grenzt den Reaktionsraum der Zelle von ihrer Umwelt ab. Trotzdem leben Zellen nicht unabhängig von ihrer Umwelt. Diverse Proteine, welche in die Plasmamembran eingelagert sind, stellen eine Verbindung des Inneren der Zelle mit der Umwelt her. Unter anderem sorgen diese Membranproteine für den Transport von spezifischen Molekülen durch die Membran oder bilden als Adhäsionsmoleküle strukturgebende Komponenten, welche das Zytoskelett über die Plasmamembran hinweg mit der Umgebung verbinden. Eine weitere Klasse von Proteinen dient der Aufnahme und Weiterleitung von Umweltsignalen. Diese sogenannten Rezeptoren sind meist membrandurchspannende Proteine, die in der Lage sind, extrazelluläre Faktoren zu binden und ein Signal in die Zelle weiterzuleiten, was zu einer Verhaltensänderung der Zelle als Antwort auf das extrazelluläre Signal führt. Rezeptoren dienen also der Informationsaufnahme und -verarbeitung von Signalen aus der Umwelt (Übersicht in: (Alberts et al., 2002)).

Einfache Signalwege, bei denen Umweltreize über Rezeptoren aufgenommen werden und das Verhalten der Zellen beeinflussen, können schon in Bakterien beobachtet werden: hier werden, bei einem "Chemotaxis" genannten Verhalten, über ein Rezeptorsystem die Konzentrationen extrazellulärer Nähr- und Abfallstoffe gemessen und dementsprechend die Rotationsrichtung der Flagellen beeinflusst (Stock and Surette, 1994). Rezeptorensysteme werden auch zur Kommunikation zwischen Zellen verwendet. Anfänge der Kommunikation zwischen Zellen sind bei der einzelligen Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zu finden. Hier kann eine Zelle eines spezifischen "Mating types" Signalstoffe absondern, die von Zellen des anderen "Mating types" über spezifische Rezeptoren erkannt werden und das Auswachsen dieser Zelle und im Endeffekt die Fusion der Zelle mit der Zelle des anderen "Mating types" auslösen (Naider and Becker, 2004). Kommunikationsprozesse zwischen Zellen oder Zellgruppen werden in mehrzelligen Organismen um ein Vielfaches komplexer, da durch diese das Verhalten von einzelnen Zellen oder Zellgruppen im Kontext des Gesamtorganismus gesteuert werden muss.

In der Entwicklung von mehrzelligen Organismen werden die Kommunikationsprozesse vor allem über extrazelluläre Signalmoleküle reguliert, die von spezifischen Zellen sezerniert

werden, um je nach Signalmolekül auf benachbarte Zellen oder über größere Distanzen hinweg die Aktivität von Zellen zu steuern. In mehrzelligen Organismen sind eine Vielzahl von solchen Zell-Zell-Kommunikationssystemen bekannt, deren Zusammenwirken letztendlich die Entwicklung und Funktion einzelner Gewebe sowie des Gesamtorganismus als Ganzes ermöglichen. Störungen in einzelnen Signalsystemen können schwere Entwicklungsschäden oder Krankheiten wie zum Beispiel Krebs auslösen. Im Zuge der Sequenzierung der Genome unterschiedlicher Organismen zeigte sich, dass viele Signaltransduktionswege, von den Rezeptoren bis zu ihren intrazellulären Interaktionspartnern, über die Speziesgrenzen hinweg hoch konserviert sind. Ein eindrucksvolles Beispiel der Konservierung genereller Signaltransduktionswege liefert das oben beschriebene "Mating type"-Signalsystem: viele Komponenten dieses Signaltransduktionsweges der Bäckerhefe zeigen Homologien zu vertebraten Proteinen, welche ebenfalls, wenn auch in anderem Kontext, in einem parallelen Signaltransduktionsweg zusammengeschlossen sind (Naider and Becker, 2004). Dies ist nur ein Beispiel für die grundlegende Bedeutung von Grundlagenforschung an einfach zugänglichen Modellorganismen. Vielfach kann durch die Aufklärung der Funktion einzelner Proteine und Signalwege in Modellorganismen auf die Funktion der homologen Proteine im Menschen geschlossen werden und somit nicht nur ein Beitrag zum Verständnis allgemeiner Funktionen zellulärer Mechanismen, sondern möglicherweise auch zum Verständnis und der Heilung menschlicher Erkrankungen geleistet werden.

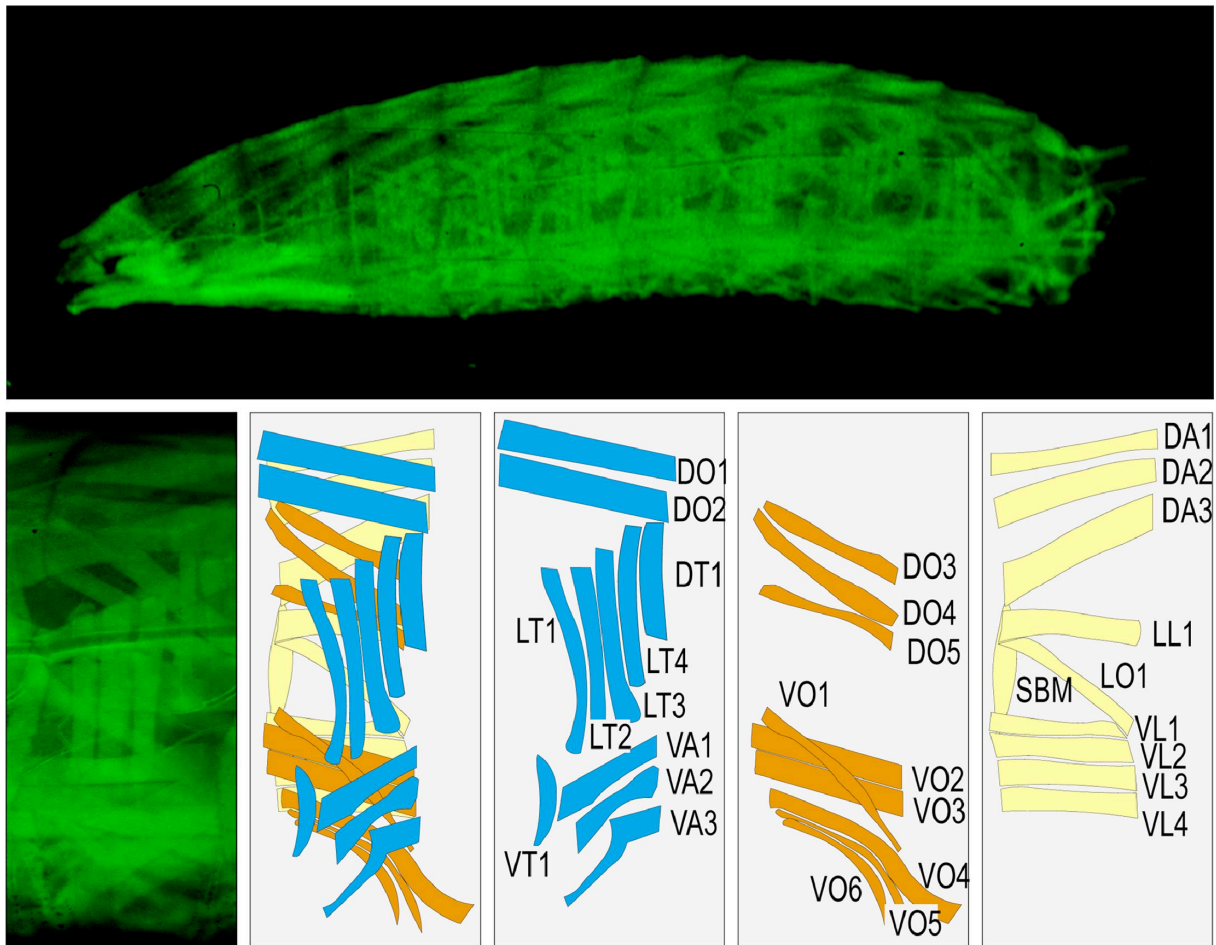
Die Taufliege *Drosophila melanogaster* (im Folgenden verkürzt als *Drosophila* bezeichnet) dient als Modellorganismus, um komplexe biologische Vorgänge einschließlich Zell-Zell-Kommunikationssysteme in einem mehrzelligen Organismus zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Zum einen ermöglicht die kurze Generationszeit und die hohe Nachkommenszahl sowie die einfache Zugänglichkeit der Embryonen für optische Untersuchungsverfahren relativ schnelle Untersuchungen an vielen Individuen, zum anderen vereinfachen eine Vielzahl von etablierten genetischen und molekularbiologischen Methoden das Arbeiten an diesem Organismus. Die bekannte Genomsequenz (Adams et al., 2000) erleichtert zudem die Lokalisierung und Zuordnung von Genen sowie deren Sequenzvergleich mit Genen anderer Organismen. Ein weiterer Vorteil von *Drosophila* als Modellorganismus zur Erforschung entwicklungsbiologischer und molekularbiologischer Fragestellungen, ist die Möglichkeit zur Etablierung transgener Fliegenlinien (Spradling and Rubin, 1982). Zum einen ermöglicht dies, unter Verwendung des *UAS/GAL4* Systems (Brand and Perrimon, 1993; Rorth, 1996), Gene ektopisch zu exprimieren, zum anderen ermöglichen Insertionen von



transposablen Elementen in verschiedenen genomischen Loci die relativ schnelle und leichte Erzeugung von Mutationen (Beinert et al., 2004; Cooley et al., 1988; Peter et al., 2002; Spradling et al., 1999; Spradling et al., 1995). Im Vergleich zum Nematoden *Caenorhabditis elegans* (im Folgenden verkürzt als *C.elegans* bezeichnet), welcher ähnliche experimentelle Vorzüge besitzt, zeigt *Drosophila* zudem auf Proteinebene eine höhere Sequenzähnlichkeit zum Menschen (Mushegian et al., 1998).

## **1.1 Die Ausbildung des somatischen Muskelsystems im *Drosophila*-Embryo**

Das somatische Muskelsystem im *Drosophila*-Embryo ist ein ideales System, um unterschiedliche Signalsysteme zu untersuchen, die im Endeffekt zur Ausbildung eines komplexen Gewebes führen. Die somatischen Muskeln bei *Drosophila* sind mesodermaler Natur und bilden in den abdominalen Hemisegmenten A2-A7 ein einfach zu untersuchendes gleichförmiges Muster aus jeweils 30 Muskeln. Jeder dieser Muskeln entspringt einer einzelnen Muskelgründerzelle und besitzt eine charakteristische Größe, Form und Position sowie spezifische epidermale Anheftungsstellen (Abb.1) (Bate, 1990; Ruiz-Gomez et al., 1997). Die Entwicklung des Muskelsystems verläuft stereotyp. Während der Gastrulation wandern *twist*-exprimierende Zellen an der ventralen Mittellinie in das Innere des Embryos ein, migrieren dann dorsalwärts und bilden das Mesoderm (Leptin and Grunewald, 1990). An diesen Migrationsprozessen ist der FGF-Rezeptor Heartless sowie die Liganden Thisbe und Pyramus aus der FGF-Familie beteiligt (Michelson et al., 1998; Stathopoulos et al., 2004). Aus den mesodermalen Zellen entstehen Strukturen wie der Fettkörper, das Herz sowie somatische und die viszerale Muskulatur (Baylies et al., 1998).



**Abb. 1: Somatisches Muskelmuster einer *Drosophila melanogaster*-Larve**

Dargestellt ist das Muskelmuster einer *Drosophila melanogaster*-Larve im Stadium L3. Die Muskeln wurden über die Expression eines *UAS-CD8-EGFP*-Konstrukts in den Muskeln mit dem *24B-GAL4* Treiber und der EGFP-Autofluoreszenz visualisiert. Anterior ist links, dorsal ist oben. In der unteren Hälfte ist die Vergrößerung eines Hemisegments sowie die schematische Zeichnung des Muskelusters und die Namen der einzelnen Muskeln in den Segmenten A2-A7 dargestellt.

DO/LO/VO: dorsale, laterale, ventrale "oblique" Muskeln.

DT/LT/VT: dorsale, laterale, ventrale transversale Muskeln.

LL/VL: laterale, ventrale longitudinale Muskeln.

DA/VA: dorsale, ventrale "acute" Muskeln.

SBM: "Segment border muscle".

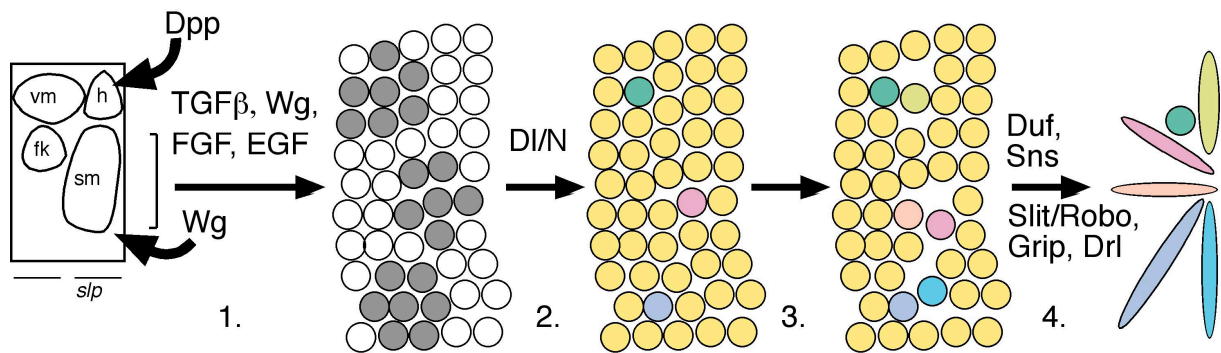
(Bate, 1990)

Das *twist*-exprimierende Mesoderm wird durch ektodermale Signale in funktionelle Gruppen eingeteilt, aus denen die Vorläufer der mesodermalen Gewebe hervorgehen. Die dorsoventrale Einteilung des Mesoderms erfolgt durch das TGF $\beta$ -Homolog Decapentaplegic (im Folgenden verkürzt als Dpp bzw. *dpp* bezeichnet), welches von dorsalen ektodermalen Zellen sezerniert wird (Frasch, 1995; Staehling-Hampton et al., 1994). Gleichzeitig erfolgt die Einteilung des Mesoderms in anterior-posteriorer Richtung durch die Segmentationsgene *even-skipped* und *sloppy-paired* sowie durch ektodermale Wingless- (im Folgenden verkürzt als Wg bzw. *wg* bezeichnet) und Hedgehog- (im Folgenden verkürzt als Hh bzw. *hh* bezeichnet) Signale. Die Vorläuferzellen für die somatischen Muskeln entstehen in lateralen

und ventralen Bereichen von Segmenten, die in der *sloppy-paired*-Expressionsdomäne unter dem Einfluss der ektodermalen Signale Wg und Dpp stehen (Azpiazu et al., 1996; Riechmann et al., 1997). Diese Zellen zeichnen sich ferner durch eine hohe Expression des Genes *twist* aus (Baylies and Bate, 1996). Aus dieser Gruppe von Zellen beginnen einzelne Zellverbände, vermittelt über verschiedene Rezeptorsysteme wie Dpp/TGF $\beta$ -Rezeptoren, Wg/Frizzled, FGF/Heartless und Rhomboid, Spitz, Vein/EGFR (Baylies et al., 1995; Buff et al., 1998; Carmena et al., 1998a; Ranganayakulu et al., 1996), das proneurale Gen *lethal of scute* zu exprimieren (Carmena et al., 1995).

Durch den Rezeptor Notch und seinen Liganden Delta wird im Folgenden ein Prozess, als "Laterale Inhibition" bezeichnet, vermittelt, durch den in jeder Gruppe eine oder zwei Zellen zu Muskelprogenitorzellen heranreifen (Baker and Schubiger, 1996; Corbin et al., 1991). Nach einer asymmetrischen Zellteilung entstehen aus jeder Muskelprogenitorzelle jeweils zwei Muskelgründerzellen (Carmena et al., 1998b; Ruiz Gomez and Bate, 1997). Diese sind durch die Lokalisierung des Transmembranproteins Dumbfounded (Ruiz-Gomez et al., 2000) auf der Zelloberfläche charakterisiert, das mit dem Transmembranprotein Sticks-and-stones der fusionskompetenten Myoblasten (Bour et al., 2000) interagiert, die sich aus den anderen Zellen mit hoher *twist*-Expression entwickelt haben (Carmena et al., 1995). Dieser Zell-Zell-Kontakt ist die Basis für die Fusion der Muskelgründerzelle mit den fusionskompetenten Myoblasten (Dworak and Sink, 2002; Taylor, 2003). Die Weiterentwicklung der Muskeln bedarf dann einer Fusion der Muskelgründerzellen mit bis zu 30 fusionskompetenten Myoblasten. Dieser Prozess führt zu einem Synzytium, wobei die Spezifität der einzelnen Muskeln in den Muskelgründerzellen festgelegt ist (Bate, 1990).

Die Identität der Muskelgründerzellen resultiert aus der Expression einer charakteristischen Kombination aus verschiedenen Markergenen wie *Krüppel* (Ruiz-Gomez et al., 1997), *slouch* (Dohrmann et al., 1990; Knirr et al., 1999), *apterous* (Bourgouin et al., 1992), *ladybird*, *vestigial*, *nautilus* (Michelson et al., 1990; Paterson et al., 1991) und/oder *muscle-segment-homeobox* (D'Alessio and Frasch, 1996; Lord et al., 1995; Nose et al., 1998). Jeder Muskel im Hemisegment unterscheidet sich von jedem anderen Muskel durch seine Form, Größe, Position und die Wahl seiner epidermalen Anheftungsstellen, den sogenannten Apodemen. Während der ersten Fusionen mit fusionskompetenten Myoblasten beginnen die Muskelvorläufer zu polarisieren. Sie bilden an ihren Enden Filopodien und beginnen ein gerichtetes Wachstum hin zu ihren späteren Apodemen (Bate, 1990), (Abb.2), Übersichten in: (Baylies et al., 1998; Frasch, 1999; Schnorrer and Dickson, 2004).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Muskelentwicklung in *Drosophila melanogaster* und der beteiligten Signalsysteme**

Das Mesoderm wird durch unterschiedliche ektodermale Signale in funktionelle Domänen aufgeteilt. So bilden dorsale mesodermale Zellen in der *sloppy-paired* (*slp*) exprimierenden Domäne unter dem Einfluss des dorsal exprimierten ektodermalen Signals Decapentaplegic (Dpp) und dem ektodermalen Signal Wingless (Wg) das Herz (h) und weiter ventral liegende Zellen die somatischen Muskeln (sm). Weiter anterior gelegene Zellen im Segment bilden die viszerale Muskeln (vm) und den Fettkörper (fk). (1.) Einzelne Zellverbände in der Kompetenzdomäne für die somatischen Muskeln beginnen unter dem Einfluss verschiedener extrazellulärer Signale das proneurale Gen *lethal of scute* (graue Zellen) zu exprimieren (Stadium 10). (2.) Über den Prozess der lateralen Inhibition, welcher das Delta (DI)/Notch (N) Signalsystem einschließt, werden aus diesen Gruppen einzelne Zellen als Muskelprogenitorzellen ausgewählt (farbige Kreise), die restlichen Zellen differenzieren zu fusionskompetenten Myoblasten (gelbe Kreise) (Stadium 11). (3.) Über eine asymmetrische Zellteilung bilden die Muskelprogenitorzellen jeweils zwei unterschiedliche Muskelgründerzellen oder eine Muskelgründerzelle und eine adulte Muskelprogenitorzelle. (Stadium 12). (4.) Muskelgründerzellen fusionieren mit fusionskompetenten Myoblasten und bilden synzytikale Muskelvorläuferzellen, ein Prozess, der die Expression von *dumbfounded* (*duf*) in den Muskelgründerzellen und von *sticks-and-stones* (*sns*) in den fusionskompetenten Myoblasten voraussetzt. An der gerichteten Migration der Muskelvorläuferzellen sind der Slit/Robo-Signalweg, der Rezeptor Derailed (Drl) sowie das intrazelluläre Protein Grip beteiligt (Stadium 12-16). (Modifiziert nach (Baylies et al., 1998)).

Während einer ersten Phase der Differenzierung der Apodeme wird *stripe* in einer Reihe von epidermalen Zellen an den Segmentgrenzen exprimiert (Frommer et al., 1996). Die Expression dieses Apodem-spezifischen Transkriptionsfaktors wird nur in Zellen aufrechterhalten, welche in Kontakt mit *vein*-exprimierenden Muskeln stehen. Dieses von den Muskeln ausgesendete Signal wird von den Apodemen über den EGF-Rezeptor aufgenommen und bewirkt die Stabilisierung der *stripe*-mRNA und die Expression von Genen, die zur Ausdifferenzierung der Apodeme führen (Golembo et al., 1999; Volk, 1999; Yarnitzky et al., 1997). In einer letzten Phase der Muskelentwicklung erfolgt die Verankerung der Muskeln an die Apodeme, welche vorwiegend über Integrine erfolgt (Brown, 1994; Gotwals et al., 1994).

## 1.2 Gerichtetes Wachstum der Muskelvorläuferzellen

Die Differenzierung des somatischen Muskelmusters erfolgt bei *Drosophila* durch das Zusammenspiel einer Vielzahl von extrazellulären Signalwegen. Während diese frühen Prozesse in der Myogenese relativ gut verstanden werden (siehe oben), sind die späteren Prozesse und hier insbesondere die Frage nach dem gerichteten Wachstum und der Auswahl der Apodeme durch spezifische Muskelvorläuferzellen noch relativ uncharakterisiert. Die Beobachtung, dass in *stripe*-Mutanten, bei denen die Differenzierung der Apodeme unterbleibt (Frommer et al., 1996), die Migration und korrekte Anheftung von Myotuben gestört ist und die ektopische *stripe*-Expression eine Fehlleitung von Muskeln bewirkt zeigt, (Becker et al., 1997; Vorbrüggen and Jäckle, 1997) dass die epidermalen Apodeme eine Rolle im gerichteten Auswachsen der Muskelvorläuferzellen spielen. Erst wenige Faktoren konnten identifiziert werden, welche von den Apodemen sezerniert, als Signale für das gerichtete Auswachsen der Muskelvorläuferzellen dienen. Neben dem Rezeptor Derailed, der in den lateral- transversalen Muskeln 1-3 (LT1-3) zur Erkennung der Apodeme notwendig ist (Callahan et al., 1996) und zusätzlich an der Musterbildung im Nervensystem beteiligt ist (Yoshikawa et al., 2003), konnte der Slit/Robo-Signalweg als eine wichtige Komponente im gerichteten Auswachsen der Muskelvorläuferzellen identifiziert werden (Kidd et al., 1999; Kramer et al., 2001).

Das *Drosophila*-Protein Slit ist ein ca. 1500 Aminosäuren großes extrazelluläres Protein, welches als Ligand für Rezeptoren der Robo-Familie dient und eine hohe Sequenzkonservierung zu Vertebraten-Proteinen aufweist (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999). Proteine der Slit-Familie bestehen aus vier parallel angeordneten "leucine rich repeats", sieben bis neun EGF-ähnlichen Domänen, ein "ALPS" (ein Motiv, welches in Agrin, Laminin, Perlecan und Slit vorkommt) und einem C-terminalen "Cystein-Knoten", welcher als ein häufiges Motiv in extrazellulären Wachstumsfaktoren vorkommt (Brose et al., 1999; Rothberg and Artavanis-Tsakonas, 1992). Slit-Proteine können proteolytisch gespalten werden (Brose et al., 1999) und eine Studie zeigt, dass proteolytische Spaltung von vertebratem Slit in dem verwendeten System notwendig für die biologische Aktivität von Slit ist (Wang et al., 1999). Weitere *in vitro*-Versuche zeigten zudem, dass Slit an Heparansulfat-Glykosaminoglykan-Zuckerketten bindet (Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001) und die volle Aktivität des Slit-Signals von diesen abhängig ist (Hu, 2001).

Ursprünglich wurde Slit bei *Drosophila* als ein Faktor identifiziert, der bei der Musterbildung im zentralen Nervensystem eine bedeutende Rolle spielt (Rothberg et al., 1988). Slit wird von

Glia-Zellen der ventralen Mittellinie sezerniert und wirkt als ein Faktor, der Axone, die einen oder mehrere der Slit-Rezeptoren aus der Robo-Familie exprimieren, daran hindert, die Mittellinie zu überqueren (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Kidd et al., 1998; Rajagopalan et al., 2000a; Rothberg et al., 1988; Rothberg et al., 1990; Simpson et al., 2000b). Zusätzlich ist Slit im zentralen Nervensystem an der Lokalisierung von Axonen in verschiedene laterale Positionen beteiligt (Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000a).

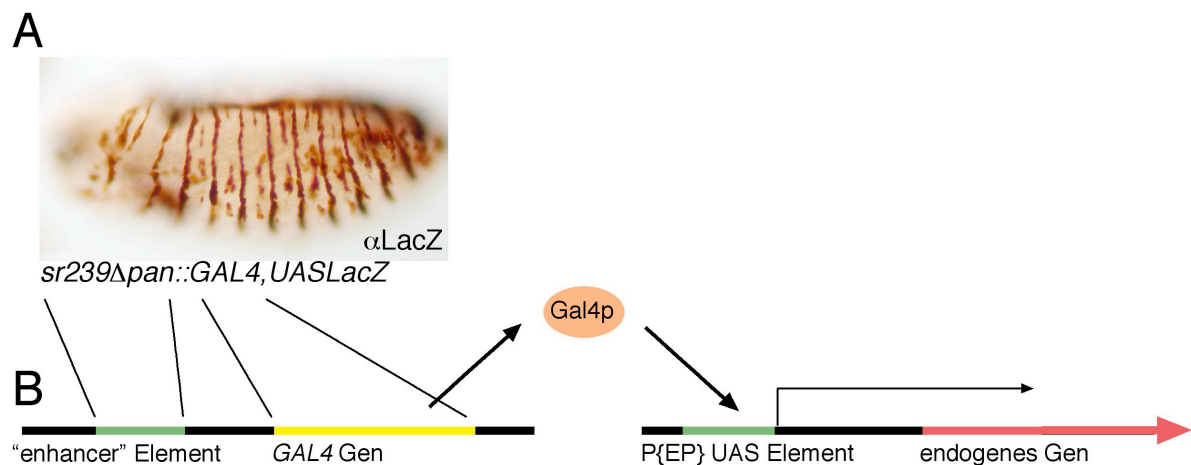
Während Slit im zentralen Nervensystem von *Drosophila* vor allem als Axon-abstoßendes Signal gelesen wird, zeigt es im Muskelsystem sowohl abstoßende als auch anziehende Eigenschaften. In der frühen Phase der Muskelentwicklung werden *robo*-exprimierende ventrale Muskelvorläuferzellen von *slit*-exprimierenden Zellen von der Mittellinie abgestoßen (Kramer et al., 2001). In einer späteren Phase der Muskelentwicklung dient dasselbe Ligand-Rezeptorsystem der Anlockung spezifischer *robo*-exprimierender ventraler longitudinaler (VL) Muskeln an ihre entsprechenden *slit*-exprimierenden Apodeme (Kramer et al., 2001).

Bei *Drosophila* werden drei Rezeptoren der Robo-Familie exprimiert: *robo*, *robo2* und *robo3*. Während *robo*- und *robo2*-Einzelmutanten schwache *slit*-mutanten-ähnliche Phänotypen aufweisen, zeigen *robo*-, *robo2*-Doppelmutanten im zentralen Nervensystem (im Folgenden verkürzt als ZNS bezeichnet) und in den Muskeln einen *slit*-Phänotyp (Kramer et al., 2001; Rajagopalan et al., 2000a; Simpson et al., 2000b). Dies zeigt, dass die Rezeptoren Robo und Robo2 die hauptsächlich an den Migrationsprozessen im Nervensystem und in den Muskeln beteiligten Rezeptoren der Robo-Familie sind.

Die Beobachtung, dass in *slit*- und *robo*-Mutanten nur einzelne Muskeln Migrationsdefekte aufweisen, lässt vermuten, dass noch andere Signalsysteme eine Rolle im gerichteten Auswachsen der Muskelvorläuferzellen spielen könnten (Kramer et al., 2001). Neben dem Rezeptor Derailed konnten noch weitere Faktoren, wie zum Beispiel das intrazelluläre Protein Grip (Swan et al., 2004) identifiziert werden, die an dem gerichteten Wachstum spezifischer Muskeln beteiligt sind. Bislange sind jedoch außer Slit keine Signale bekannt, welche von den Apodemen sezerniert, eine anziehende Wirkung auf migrierende Muskelvorläuferzellen ausüben (Schnorrer and Dickson, 2004).

### 1.3 Identifikation neuer Faktoren, die am gerichteten Wachstum von Muskelvorläufern beteiligt sind

Um neue Liganden oder andere Faktoren zu identifizieren, die am gerichteten Wachstum von Muskelvorläuferzellen beteiligt sind, wurde ein "Missexpressionsscreen" initiiert, in dem unter Zuhilfenahme des *GAL4/UAS*-Systems aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Rorth, 1996) endogene Gene in Zellen an der Segmentgrenze und in einem schmalen Streifen zwischen den Segmentgrenzen fehlexprimiert werden konnten (Molitor, 2002; Staudt, 2002). Dieser "Missexpressionsscreen" involvierte zwei Komponenten: zum einen eine Fliegenlinie, in der das *GAL4*-Gen unter der Kontrolle des *sr239* $\Delta$ *pan*-Enhancerfragments an den Segmentgrenzen und in einem schmalen Streifen innerhalb der Segmentgrenzen exprimiert wird (Piepenburg et al., 2000) und zum anderen eine Kollektion von Fliegenlinien, die transposable EP-Element-Insertionen, an zufälligen Orten im Genom tragen. Diese EP-Elemente enthalten neben einem Basispromotor *UAS*-Sequenzen ("upstream activation sites"), an denen das *GAL4*-Protein binden und über den Promotor des EP-Elements die Transkription benachbarter Gene aktivieren kann (Abb. 3) (Rorth, 1996).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des "Missexpressionsscreens"**

A) Darstellung der Expressionsdomänen der verwendeten Treiberlinie *in vivo* mittels anti-LacZ-Antikörperfärbung (nach (Staudt, 2002)).

B) Die sogenannte Treiberlinie enthält das *GAL4*-Transgen aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* unter der Kontrolle des *sr239* $\Delta$ *pan*-"enhancer"-Elements. Nach der Kreuzung von Jungfrauen dieser Treiberlinie mit Männchen der EP-Linien kann das *GAL4*-Protein an seine *UAS*-Sequenzen im EP-Element binden und somit die Transkription mit Hilfe eines Basalpromotors der 3' vom EP-Element gelegenen Gene initiieren (Molitor, 2002; Staudt, 2002).

Ziel des "Missexpressionsscreens" war es, Gene zu identifizieren, deren Produkte entweder für anziehende oder abstoßende extrazelluläre Signale kodieren oder an Produktion, Sezernierung und Modifizierung von extrazellulären Signalen beteiligt sind. Die

Missexpression dieser Gene mit der verwendeten Treiberlinie sollte im Muskelsystem zu einem Phänotypen führen (Molitor, 2002; Staudt, 2002).

Insgesamt wurden Männchen von 4058 verschiedenen EP-Element-enthaltenden Linien mit Jungfrauen der *sr239*  $\square$  *pan-GAL4*-Treiberlinie gekreuzt und diejenigen Fliegenlinien erneut untersucht, bei denen diese Kreuzung in der Nachkommenschaft bei 29°C Letalität erzeugt. Anschließend wurde der Insertionsort der EP-Elemente bestimmt und die möglicherweise beteiligten Gene in funktionelle Gruppen eingeteilt. So konnten 65 EP-Element-enthaltende Fliegenlinien (1,6% der Ausgangslinien) identifiziert werden, in denen der Effekt der Missexpression auf die Ausbildung des Muskelmusters näher untersucht wurde. In 78% der Fälle konnte in den Nachkommen dieser Kreuzungen ein Defekt in der Ausbildung des embryonalen Muskelmusters beobachtet werden (Molitor, 2002; Staudt, 2002).

Die so identifizierten Gene ließen sich in mehrere funktionelle Gruppen einteilen, von denen eine zwei mögliche Kandidatengene enthielt, deren Produkte am Metabolismus von Heparansulfat-Proteoglykanen (im Folgenden verkürzt als HSPG bezeichnet) beteiligt sind (Tab. 1).

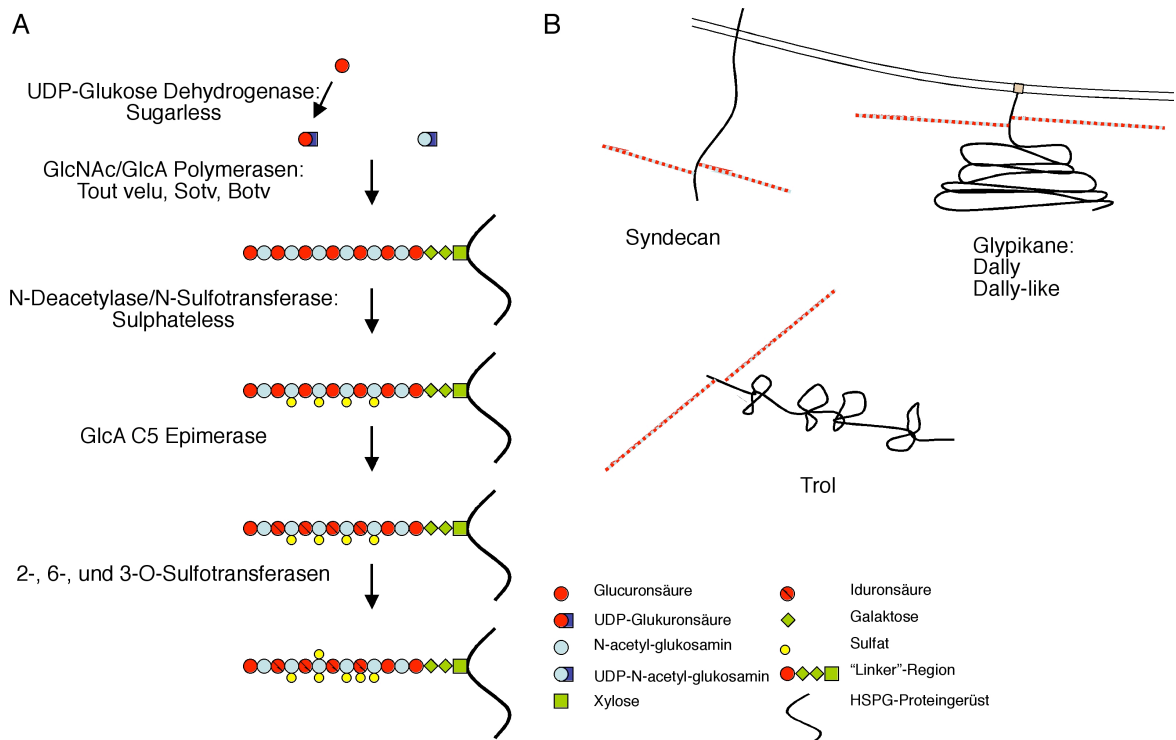
**Tab. 1: Im "Screen" identifizierte Gene, deren Produkte am Metabolismus von HSPG beteiligt sind**

P{EP}	Insertion	Gen und Funktion
35161 21140	3' ("antisense") zu im 2. Intron von	<i>sulfateless</i> , N-Deacetylase / N-Sulfatase <i>sd</i> c, Heparansulfat-Proteoglykan

HSPG können als Komponenten der extrazellulären Matrix und der Basallamina oder über Transmembrandomänen oder GPI- (glykosylphosphatidylinositol) Anker an der Zellmembran befestigt vorliegen (Abb. 4). Zu den *Drosophila*-HSPG werden verschiedenste Proteine gezählt, die jeweils eines gemeinsam haben: an das Protein-Grundgerüst sind mehrere Heparansulfat-Glykosaminoglykan- (im Folgenden verkürzt als HSGAG bezeichnet) Zuckerketten im extrazellulären Bereich kovalent gebunden (Khare and Baumgartner, 2000; Nakato et al., 1995; Park et al., 2003; Spring et al., 1994; Voigt et al., 2002). Die Biosynthese dieser HSGAG-Ketten erfolgt im Golgi-Apparat. Zuerst wird über ein Tetrasaccharid, welches an spezifische Serin-Reste des Proteins kovalent gebunden wird, in einer alternierenden Abfolge der Zuckerreste Glukuronsäure und N-acetylglukosamin, eine unverzweigte 80-150 Disaccharide lange Zuckerkette synthetisiert (Couchman, 2003; Perrimon and Bernfield, 2000; Selleck, 2000). Ihre biologische Aktivität erhalten die HSGAG-Ketten durch sekundäre Modifizierungen. Durch N-deacetylierung, N-sulfatierung



und nachfolgende C5-Epimerisierung, 2-O-, 6-O- und 3-O-Sulfatierung entstehen auf der linearen Zuckerkette hoch komplexe Muster von Inseln stark modifizierter anionischer Bereiche, die durch Bereiche relativ geringer Sulfatierung getrennt werden (Abb. 4) (Esko and Selleck, 2002).



**Abb. 4: Darstellung der Biosynthese von HSGAG-Ketten, Illustration der verschiedenen HSPG bei *Drosophila melanogaster***

A) Darstellung der Biosynthese von HSGAG-Ketten und der beteiligten Enzyme. Die UDP-Glukose-Dehydrogenase Sugarless stellt die für die Synthese benötigten Zucker-Nucleotide UDP-Glukuronsäure her. Die Synthese der HSGAG-Ketten erfolgt an spezifischen Serin-Resten des "Proteingerüsts". Über die Glukuronsäure/N-acetylglukosamin-Polymerasen wird ausgehend von einem Tetrasaccharid die HSGAG-Kette aus einer alternierenden Abfolge beider Zucker synthetisiert. Später werden die HSGAG-Ketten enzymatisch durch Deacetylierung, N-Sulfatierung, Epimerisierung sowie O-Sulfatierung unterschiedlich modifiziert.

B) Schematische Darstellung der unterschiedlichen HSPG in *Drosophila melanogaster*. Syndecane und Glypikane sind zelloberflächenassoziierte HSPGs, wobei Syndecan über eine Transmembrandomäne und die Glypikane über einen GPI-Anker an der Zellmembran befestigt sind. Trol ist ein nicht-zelloberflächengebundenes HSPG der extrazellulären Matrix und Basalmembranen. (modifiziert nach (Perrimon and Bernfield, 2000)).

HSGAG-Ketten weisen eine erhebliche Dichte an Information und Komplexität auf. Sie variieren nicht nur in ihrer Länge, der Art und dem Ausmaß ihrer Modifizierungen und dem Verhältniss der modifizierten Bereiche zu den unmodifizierten Bereichen auf den Ketten, sondern sie liegen als HSPG gebunden an spezielle Proteingerüste vor. Diese erhöhen noch einmal die Komplexität der HSGAG. Sie bestimmen die zelluläre und subzelluläre Lokalisierung sowie möglicherweise die Spezifität (Art und Ausmaß der Sulfatierungen) der

HSGAG-Ketten. Die HSPG-Proteingerüste können mehrere HSGAG-Ketten tragen und werden grob in zwei Klassen eingeteilt: extrazelluläre HSPG, wie das *Drosophila*-Trol, welche meist feste Bestandteile der extrazellulären Matrix und der Basallamina sind, sowie zelloberflächengebundene HSPG, die entweder über eine Transmembrandomäne (Syndecane) oder einen GPI-Anker, wie die Glypicane Dally und Dally-like (im Folgenden verkürzt als Dlp bzw. *dlp* bezeichnet) an der Zellmembran gebunden sind (Abb. 4) (Khare and Baumgartner, 2000; Nakato et al., 1995; Park et al., 2003; Perrimon and Bernfield, 2000; Spring et al., 1994; Voigt et al., 2002).

Versuche mit *Drosophila* zeigten, dass HSGAG-Ketten eine essentielle Funktion in extrazellulären Signalwegen haben. Maternal und zygotisch mutante Embryonen in Genen, in denen die Synthese der HSGAG-Ketten gestört sind, zeigen starke Segmentpolaritätsphänotypen, ähnlich denen von *wg*- und *hh*-Mutanten (Binari et al., 1997; Häcker et al., 1997; Haerry et al., 1997; Lin and Perrimon, 1999; The et al., 1999). Weitere Versuche konnten zudem zeigen, dass in diesen Mutanten neben den Wg- und Hh-Signalwegen auch die FGF- und TGF $\beta$ -Signalwege gestört sind (Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Lin et al., 1999; Takei et al., 2004). Die Funktion der HSGAG-Ketten besteht möglicherweise darin,

- a) extrazelluläre Rezeptor-Liganden in der extrazellulären Matrix zu stabilisieren
- b) ihre Diffusion zu ermöglichen und/oder
- c) an den Zielzellen an der Stabilisierung, Konzentration oder der Präsentation des extrazellulären Signals an den Rezeptor oder aber
- d) an der Bildung oder Stabilisierung eines Signal-Rezeptor Komplexes beteiligt zu sein (Belenkaya et al., 2004; Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Desbordes and Sanson, 2003; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Lin et al., 1999; Takei et al., 2004; The et al., 1999). Die Tatsache, dass die Effizienz vieler Signalwege stark vom Vorhandensein extrazellulärer HSGAG-Ketten abhängig ist, wirft die Möglichkeit auf, dass diese auch im Muskelsystem essentielle Faktoren für Signalwege darstellen, die an der Ausbildung des Muskelmusters beteiligt sind.

Im "Missexpressionsscreen" wurde zum einen das Gen für die N-Deacetylase/ N-Sulfatase Sulfateless (im Folgenden verkürzt als Sfl bzw. *sfl* bezeichnet), welches sekundäre Modifizierungen an HSGAG-Ketten vornimmt (Lin and Perrimon, 1999; Toyoda et al., 2000a), als möglicher Kandidat identifiziert und zum anderen das Gen für Syndecan (im Folgenden verkürzt als Sdc bzw. *sdc* bezeichnet), ein zelloberflächen-gebundenes HSPG,

bestehend aus dem Sdc-Proteingerüst, an welches HSGAG-Zuckerketten kovalent gebunden sind (Tab. 1 und Abb. 4) (Spring et al., 1994).

*sfl* wurde über das P-Element HDEP 35161 identifiziert, welches am 3'Ende der *sfl*-Transkriptionseinheit inseriert ist (Tab. 1). P-Element-assoziierte Überexpression mit der verwendeten *sr[pan-GAL4]*-Linie (Piepenburg et al., 2000) resultiert in embryonaler Letalität, die auf eine Transkription einer *sfl*-„antisense“-mRNA im Bereich der Segmentgrenzen und einer damit verbundenen Reduktion der Menge des endogenen *sfl*-Transkripts zurückzuführen sein könnte (Molitor, 2002; Staudt, 2002). Maternal und zygotische *sfl*-Mutanten zeigen unter anderem starke Segmentpolaritätsphänotypen (Lin and Perrimon, 1999) und Defekte in der FGF-abhängigen dorsalen Migration des invaginierten Mesoderms (Lin et al., 1999). In diesen Mutanten konnte die Funktion von Sfl bei gerichteten Migrationsprozessen von Muskelvorläuferzellen nicht endgültig abgeklärt werden, da in diesen, bedingt durch die pleiotropen Defekte bei der Determinierung und Migration des Mesoderms, die Ausbildung des Muskelsystems schon in einer früheren Phase gestört ist.

Sfl beeinflusst die Modifizierung aller HSGAG-Ketten und beeinträchtigt somit die Funktion aller HSPG (Toyoda et al., 2000a). Das zweite im "Missexpressionsscreen" identifizierte Gen, dessen Produkt am Metabolismus von HSPG beteiligt ist, kodiert für Sdc, eines der vier bei *Drosophila* identifizierten HSPG (Spring et al., 1994). Es wäre also möglich, dass durch Sfl modifizierte HSGAG-Ketten, neben den beschriebenen frühen Prozessen auch für spätere gerichtete Migrationsprozesse von Muskelvorläuferzellen essentiell sind und Sdc ein spezifisches, für diesen Prozess wichtiges HSPG darstellt.

*sdc* wurde im Screen durch das EP-Element HDEP22140 als Kandidat für einen Faktor, der am gerichteten Auswachsen der Muskelvorläuferzellen beteiligt ist, identifiziert. Dieses EP-Element ist im zweiten Intron der *sdc*-Transkriptionseinheit inseriert. Die Überexpression von diesem EP-Element führt zu der Expression eines verkürzten *sdc*-Transkripts und resultiert in einem starken Defekt im embryonalen Muskelmuster. Weiterhin zeigt eine RNA *in situ*-Hybridisierung in Wildtyp-Embryonen gegen das endogene *sdc*-Transkript unter anderem eine Färbung im somatischen Mesoderm und an den Apodemen (Molitor, 2002). Der Muskelphänotyp nach Überexpression einer verkürzten *sdc*-Variante sowie die endogene Expression des Gens in relevanten Geweben bzw. Zellpopulationen macht *sdc* zu einem guten Kandidaten für einen Faktor, der am gerichteten Wachstum von Muskelvorläuferzellen beteiligt sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Sdc eine Rolle im Slit/Robo-Signalweg während gerichteter Migrationsprozesse spielt.

## 2 Ergebnisse

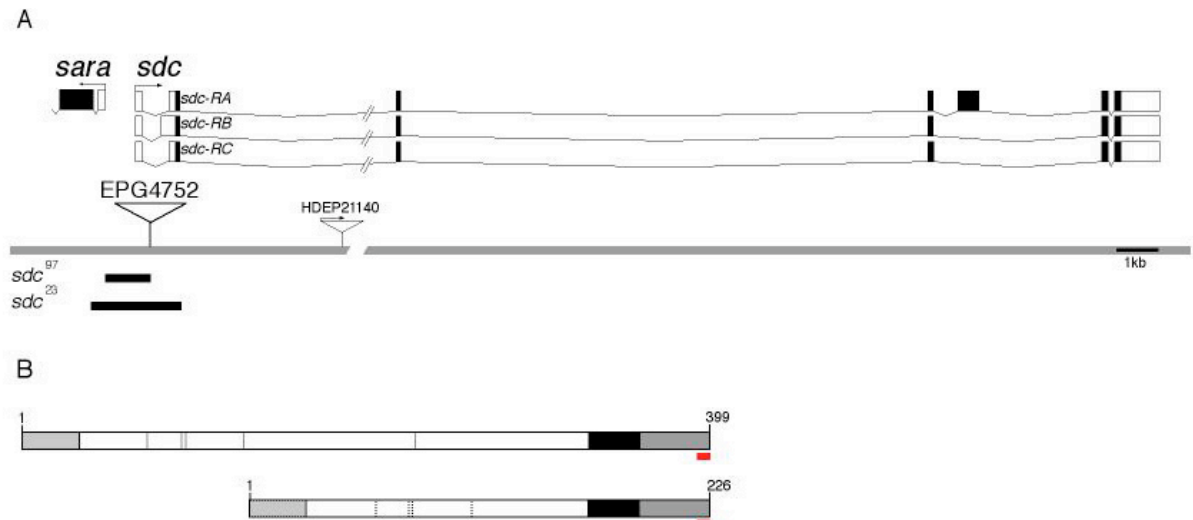
*sdc* kodiert für ein Transmembranprotein mit einer kurzen C-terminalen cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer relativ langen extrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne trägt vier bzw. fünf Serin-Reste, die als Bindestellen für die HSGAG-Ketten dienen (Abb. 5B) (Spring et al., 1994). *sdc*-Überexpression mit Hilfe des EP-Elements HDEP21140 (Abb. 5A) und einer *GAL4*-Treiberlinie, die das *GAL4*-Transgen an den Segmentgrenzen und in einem schmalen Streifen von Zellen zwischen diesen exprimiert, bewirkt starke Defekte im embryonalen Muskelmuster (Molitor, 2002). Einen zusätzlichen Hinweis auf eine mögliche Funktion von Sdc bei der Regulation des gerichteten Auswachsens der Muskelvorläuferzellen liefert die Beobachtung, dass *sdc* während der Embryogenese unter anderem im Mesoderm, in epidermalen Segmentgrenzen und später in den Apodemen exprimiert ist. Somit exprimieren alle Gewebe bzw. Zellverbände *sdc*, welche an der Ausbildung des Muskelmusters beteiligt sind (Molitor, 2002).

### 2.1 Erzeugung von *sdc*-mutanten Allelen

Um zu prüfen, ob Sdc tatsächlich eine Funktion während des gerichteten Wachstums von Muskelvorläuferzellen hat, wurden mutante Allele von *sdc* erzeugt.

Das *sdc*-Gen umfasst einen relativ großen genomischen Bereich von 88 kbp in der Region 57E1-6 des rechten Chromosomenarms des zweiten Chromosoms. Es besteht aus 7 Exons, wobei die Exons 2 und 3 durch ein 68 kbp großes Intron getrennt werden. Von einem gemeinsamen Transkriptionsstart entstehen durch alternatives Spleißen drei Transkripte ((Spring et al., 1994) und Annotation Flybase ([www.flybase.org](http://www.flybase.org))). Während das Transkript *sdc-RA* alle 7 Exons einschließt, fehlt das 5. Exon in den Transkripten *sdc-RB* und *sdc-RC*, wobei sich *sdc-RB* in der Wahl eines Spleiß-Akzeptors im unkodierenden Bereich von Exon 2 wiederum von den Transkripten *sdc-RA* und *sdc-RC* unterscheidet (Abb. 5A). Die Translation der Transkripte führt zu zwei unterschiedlichen Proteinvarianten, die sich in der Länge ihrer extrazellulären Domäne und in der Anzahl ihrer Aminosäurereste unterscheiden, die als putative Akzeptoren für die HSGAG-Ketten fungieren (Abb. 5B). Im genomischen Bereich von *sdc* sind mehrere P-Element-Insertionen bekannt, unter anderem das im Missexpressionsscreen verwendete P-Element HDEP21140, welches im 2. Intron inseriert ist, sowie das P-Element EP(2)G4754. Dieses P-Element ist im ersten Intron von *sdc* inseriert,

320 bp vom Transkriptionsstart sowie 668 bp vom Translationsstartkodon im 2. Exon entfernt und wurde zur Erzeugung von Mutanten über unpräzise Remobilisation des P-Elements verwendet (Abb. 5 und Material & Methoden Kap. 4.3 und 4.3.1).



**Abb. 5.: Genomische Organisation des *sdc*-Locus**

A) *sdc* umfasst einen 88kbp großen Bereich in der Region 57E1-6 auf dem rechten Chromosomenarm des zweiten Chromosoms. Durch alternatives Spleißen entstehen die Transkripte *sdc-RA*, *sdc-RB* und *sdc-RC*. Die Vierecke Kennzeichnen die Exons, schwarze Vierecke kennzeichnen den offenen Leserahmen. Die Position der verwendeten P-Elemente ist durch Dreiecke markiert und die Größe der erzeugten Deletionen mit schwarzen Balken gekennzeichnet.

B) Die Translation führt zu zwei Proteinvarianten, welche sich in der Länge ihrer extrazellulären Domäne und in der Zahl der putativen HSGAG-Akzeptoren unterscheiden. Signalsequenzen sind gepunktet, die Transmembrandomäne schwarz und die cytoplasmatische Domäne grau dargestellt. Die putativen HSGAG-Akzeptorreste sind als gepunktete Linien gekennzeichnet. Der rote Balken kennzeichnet das für die Antikörperproduktion verwendete Epitop. Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der Aminosäuren.

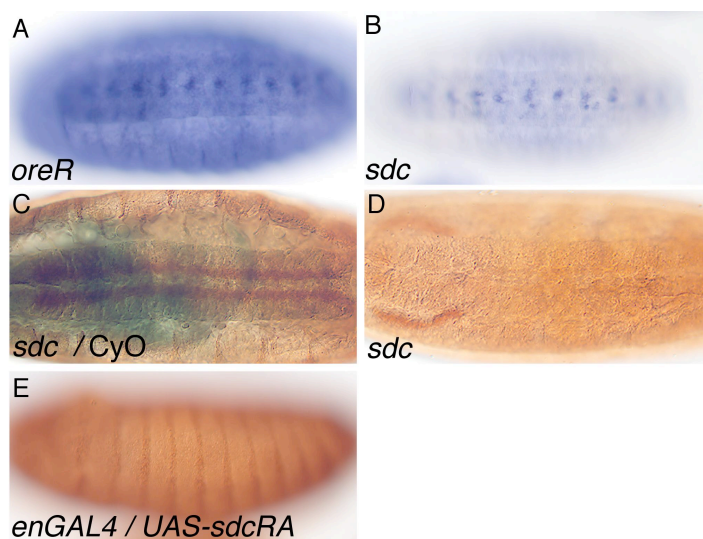
Aus 600 Fliegenlinien, die eine Remobilisierung des P-Elements zeigten, konnten über PCR-Analyse (Material & Methoden Kap. 4.1.5.1) mehrere Fliegenlinien identifiziert werden, die Deletionen im genomischen Bereich um die ursprüngliche Insertionsstelle des P-Elements aufweisen.

Von diesen zeigt das Allel *sdc*<sup>23</sup> eine relativ große Deletion von 2220 bp, bei der der *sdc*-Transkriptionsstart sowie das erste und zweite Exon mitsamt dem Translationsstartkodon entfernt ist. *sdc*<sup>97</sup> zeigt eine 1086 bp große Deletion, die den Transkriptionsstart sowie das erste Exon und Teile des ersten Introns beinhaltet (Abb. 5A).

Um zu prüfen, ob diese Deletionen Null-Mutanten für *sdc* darstellen, wurde eine RNA *in situ*-Hybridisierung mit einer Sonde gegen das *sdc*-Transkript durchgeführt (Material & Methoden Kap. 4.1.8, 4.2.1 und 4.2.4). Dabei konnte in *sdc*<sup>23</sup> und *sdc*<sup>97</sup> homozygot mutanten Embryonen keine Färbung in fast allen Geweben, in denen zygotische *sdc*-Transkription vorliegt, nachgewiesen werden. Die Ausnahme bilden einige Zellen des ZNS, in denen auch

in homozygot mutanten Embryonen noch eine Färbung detektiert wurde (Abb. 6A+B). Dieses Ergebnis deutet auf ein alternatives, nicht annotiertes *sdc*-Transkript hin, welches einen alternativen, von den Deletionen nicht betroffenen Transkriptionsstart aufweist.

Um zu prüfen ob dieses putative Transkript für ein funktionelles Sdc-Protein kodiert, wurde eine Antikörperfärbung mit einem gegen ein konserviertes C-terminales Epitop des Sdc-Proteins gerichteten Antikörper (Abb. 5B, Material & Methoden Kap. 4.2.2 und 4.2.3) auf Embryonen der Deletionsmutanten durchgeführt. Während mit diesem Antikörper die endogenen Expressionsdomänen sowie ektopische Expression eines *sdc*-Transgens nachzuweisen ist (Abb. 6C+E), konnte in homozygot *sdc*<sup>23</sup>- und *sdc*<sup>97</sup>-mutanten Embryonen mit diesem Antikörper kein Sdc-Protein mehr detektiert werden, auch nicht im Bereich des potenziellen alternativen Transkripts (Abb. 6D). Hieraus ergibt sich, dass die erzeugten *sdc*-Allele entweder Null- oder zumindest starke hypomorphe *sdc*-Allele darstellen. Das in den beiden Allelen noch zu detektierende *sdc*-Transkript scheint somit für kein Protein mit dem für alle bekannten Sdc-Proteinvarianten konservierten Carboxyterminus zu kodieren.



**Abb. 6: In *sdc*-mutanten Embryonen kann kein Sdc-Protein mit einem anti-Sdc-Antikörper nachgewiesen werden**

A) und B) Ventralansicht von Embryonen des Stadiums 14 nach einer RNA *in situ*-Hybridisierung mit einer Sonde gegen *sdc*. Während im Wildtyp (*oreR*) eine starke ubiquitäre Färbung in der Epidermis wie auch im ZNS zu sehen ist, kann in homozygot *sdc*<sup>23</sup>-mutanten Embryonen nur eine Färbung in einigen Zellen des ZNS und eine leichte Färbung des Mitteldarms beobachtet werden.

C), D), E) Embryonen des Stadiums 16 (C, D) (Ventralansicht) bzw. 9 (E)

(Lateralansicht) nach Antikörperfärbungen mit dem anti-Sdc Antikörper. C) In *sdc*<sup>23</sup>/CyO Embryonen kann eine Färbung auf den Axonen des ZNS sowie an den Apodemen beobachtet werden. D) In homozygoten *sdc*<sup>23</sup>-Embryonen aus der gleichen Färbung kann, außer einer wahrscheinlich unspezifischen Färbung in den Speicheldrüsen, kein Protein mit dem anti-Sdc Antikörper detektiert werden. E) Der anti-Sdc Antikörper erkennt die ektopische Expression eines *sdc*-Transgens.

Am 5'Ende von *sdc* liegt in Kopf-an-Kopf-Orientierung das Gen *sara* (*smad anchor for receptor activation*), von dem vermutet wird, es könnte eine Rolle im

TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweg spielen (Bennett and Alpey, 2002). Beide Transkriptionsstartpunkte liegen nur 750 bp voneinander entfernt. In allen identifizierten *sdc*-Deletionsmutanten sind auch Teile der *sara*-Transkriptionseinheit oder der potenziellen Promotorregion betroffen (Abb. 5A). So sind in der *sdc*<sup>23</sup>-Mutante, welche in allen folgenden

Experimenten Verwendung findet und homozygot als "*sdc*-Mutante" bezeichnet wird, zusätzlich zu der Deletion der ersten beiden Exone von *sdc*, der Transkriptionsstartpunkt sowie das erste Exon und die ersten 20 bp des zweiten Exons von *sara* deletiert. Diese Deletion repräsentiert also höchstwahrscheinlich eine Doppelmutante für *sdc* und *sara*. *sdc*-mutante Embryonen zeigen Phänotypen in den Muskeln und im ZNS (Abb. 7 C+D und Tab. 2) und es war somit wichtig zu klären, ob die *sdc*-Phänotypen von der Mutation des *sdc*-und/oder des *sara*-Gens stammen.

Um diesen Punkt klären zu können, wurde versucht, durch eine Transgen-vermittelte Expression des *sdc*-Gens die Phänotypen zu normalisieren. Zu diesem Zweck wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem eine *sdc-RA*-cDNA in den pUAST-Vektor kloniert wurde (*UAS-sdc-RA*) um somit eine gerichtete Expression von *sdc* mit Hilfe des *GAL4/UAS*-Systems (Brand and Perrimon, 1993) zu vermitteln (Material & Methoden Kap. 4.1.5.3, 4.1.7.1, 4.2.6 und 4.3.2). Dabei zeigte sich, dass eine ubiquitäre Expression von *sdc* unter Verwendung der *daughterless-GAL4*-Treiberlinie (Material & Methoden Kap. 4.3) in *sdc*-mutanten Embryonen die *sdc*-Phänotypen im ZNS und in den Muskeln vollständig zum Wildtyp (Abb. 7E+F und Tab. 2) normalisiert. Die vollständige Normalisierung der Phänotypen durch das Einbringen Transgen-vermittelter *sdc*-Expression in *sdc*-mutanten Embryonen zeigt, dass die im Rahmen dieser Promotion untersuchten Phänotypen durch die Mutation der *sdc*-Transkriptionseinheit induziert worden sind. Ferner zeigt die vollständige Normalisierung, dass das Transgen funktionelle Sdc-Aktivität bereitstellen kann.

### **2.1.1 *sdc*-Mutanten zeigen Defekte im Muskelmuster und im Zentralen Nervensystem**

Mit den *sdc*-Mutanten sollte als erstes untersucht werden, ob Sdc eine Funktion im gerichteten Auswachsen von Myotuben während der Embryogenese hat. Aus diesem Grund wurden die Muskeln in *sdc*-mutanten Embryonen mit dem anti-Mhc (□MHC) Antikörper angefärbt (Material & Methoden Kap. 4.2.1 und 4.2.2) und auf Defekte im Muskelmuster hin untersucht.

*sdc*-Mutanten sind semilethal und die Embryonen weisen verschiedene Defekte im Muskelmuster auf. Während des Auswachsens der Myotuben im Stadium 13 können Fehlleitungen von ventralen Muskeln beobachtet werden. In Wildtyp-Embryonen wachsen die ventralen Muskeln entlang der Innenseite der Epidermis, ventral des ZNS, in Richtung der Apodeme auf die Mittellinie zu, überqueren diese jedoch nie. In *sdc*-mutanten Embryonen

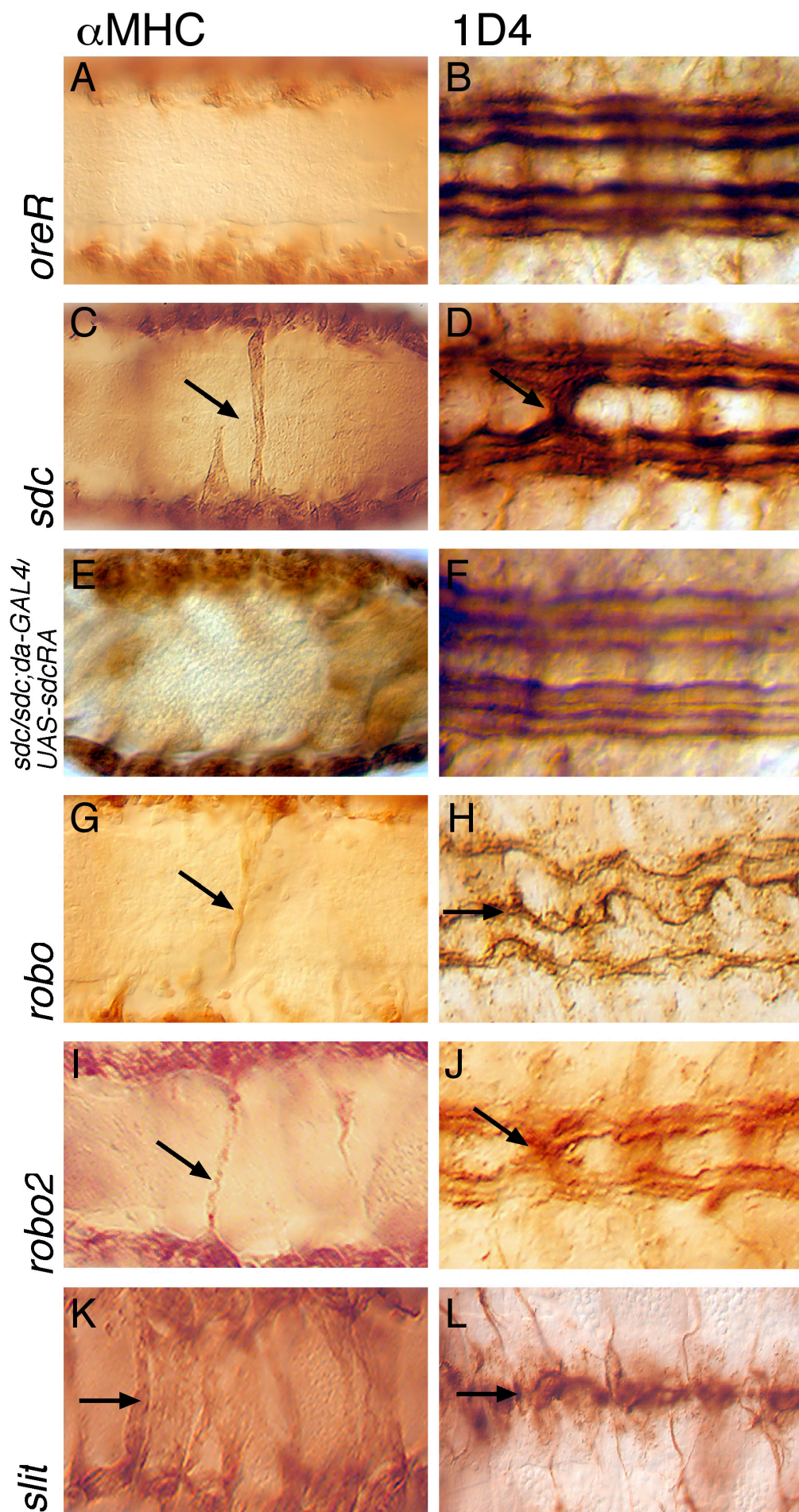
überwachsen jedoch einzelne dieser Muskelvorläufer die ventrale Mittellinie dorsal vom ZNS und binden später an Apodeme auf der anderen Seite des Hemisegments (Abb. 7A+C und Tab. 2). In älteren Embryonen sind außerdem fehlgeleitete, fehlende und abgerundete Muskeln in lateralen Teilen des Muskelsystems zu beobachten, welche auf Defekte in der Migration und/oder der Anheftung dieser Muskeln zurückzuführen sein könnten (Daten nicht gezeigt).

Die Antikörperfärbung mit dem anti-Sdc-Antikörper ( $\square$ Sdc) zeigt eine starke Färbung der longitudinalen und transversalen Axone der Nervenzellen im ZNS (Abb. 6C). Um eine mögliche Funktion von Sdc im ZNS zu untersuchen, wurde eine Antikörperfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 1D4 gegen Fasciclin II (im Folgenden verkürzt als FasII bezeichnet) durchgeführt (Material & Methoden Kap. 4.2.2), welcher jeweils drei FasII-exprimierende, parallel zur Mittellinie laufende longitudinale Axonbündel auf jeder Seite der Mittellinie anfärbt. Dabei konnte in *sdc*-mutanten Embryonen ein relativ schwacher, aber penetranter Phänotyp nachgewiesen werden. Während in Wildtyp-Embryonen 1D4-gefärbte Axonbündel die Mittellinie niemals überqueren, zeigen *sdc*-mutante Embryonen in einigen Segmenten Überquerungen solcher Axone über die Mittellinie (Abb. 7B+D und Tab. 2).

Der Vergleich der Phänotypen im Muskelsystem und im ZNS zeigt mehrere Gemeinsamkeiten. Die Defekte in den Muskeln und im Nervensystem betreffen vor allem die ventralen Bereiche der Gewebe, es erfolgen Fehlleitungen während des gerichteten Wachstums und ein unerlaubtes Wachstum einzelner Muskeln bzw. Axone über die Mittellinie hinweg.

Sdc ist ein HSPG. Studien an Mutanten, die an der Biosynthese der HSPG beteiligt sind, (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Lin et al., 1999; Takei et al., 2004; The et al., 1999) sowie an anderen *Drosophila*-HSPG (Baeg et al., 2004; Belenkaya et al., 2004; Desbordes and Sanson, 2003; Han et al., 2004a; Kirkpatrick et al., 2004; Kreuger et al., 2004) weisen darauf hin, dass diese Klasse von Proteinen eine Rolle in der Regulation von extrazellulären Signalwegen spielt. Auf der Suche nach extrazellulären Signalmolekülen, die die Migration von Zellen im Bereich der Mittellinie regulieren und mit Sdc interagieren könnten, wurde Slit als vielversprechender Kandidat identifiziert.





**Abb. 7: Muskel- und Nervenphänotypen in *sdc*-mutanten Embryonen im Vergleich zu Mutanten im Slit/Robo-Signalweg**

A), C), E), G), I), K) Ventrale Ansicht des embryonalen Muskelmusters (anti-MHC Antikörper) in Embryonen des Stadiums 14-15 sowie B), D), F) H), J), L) des embryonalen Nervensystems (1D4-Antikörper) in Embryonen des Stadiums 16.

A) und B) Wildtyp-Embryo mit normaler Ausbildung der ventralen Muskeln und der zweimal drei 1D4-gefärbten longitudinalen Axonbündel. Weder die Muskeln noch die 1D4-gefärbten Axone überqueren die Mittellinie.

C) und D) *sdc*-mutante Embryonen zeigen Überquerungen einzelner Muskeln und innerer 1D4-gefärbter Axone über die Mittellinie (siehe Pfeile).

E) und F) Ubiquitäre Überexpression von *sdc* in *sdc*-mutanten Embryonen führt zu einer Normalisierung des *sdc*-Phänotyps.

G) und H) *robo*-mutante Embryonen zeigen Überquerungen einzelner Muskeln über die Mittellinie und die Fusion der inneren 1D4-gefärbten Axone in der Mittellinie (siehe Pfeile).

I) und J) *robo2*-mutante Embryonen zeigen Überquerungen einzelner Muskeln und innerer 1D4-gefärbten Axone über die Mittellinie (siehe Pfeile).

K) und L) In *slit*-mutanten Embryonen kommt es zur Überquerung fast aller ventralen Muskeln über die Mittellinie und zu einer Fusion aller 1D4-gefärbten Axone in der Mittellinie.

**Tab. 2: *sdc*-mutante Phänotypen und genetische Interaktionen**

Genotyp <sup>c</sup>	ML <sup>d</sup> -Überquerung von Muskeln/Embryo <sup>a</sup>	Anzahl der untersuchten Embryonen	Überquerungen der ML <sup>d</sup> von inneren 1D4-gefärbten Axonen (%) <sup>b</sup>	Anzahl der untersuchten Segmente	Segmente mit zusätzlichen LT Muskeln	Anzahl der untersuchten Segmente
<i>sdc / sdc</i>	1.1	20	17	209	-	-
<i>sdc/sdc;UAS-sdc/da-GAL4</i>	0	20	0	209	-	-
<i>robo / robo</i>	0.6	20	100 <sup>e</sup>	220	-	-
<i>robo2 / robo2</i>	1.6	20	36	198	-	-
<i>slit / slit</i>	16	20	100 <sup>f</sup>	220	-	-
<i>sdc / +</i>	0	20	0	209	0	204
<i>slit / +</i>	0	20	0.6	462	1	222
<i>slit, + / +, sdc</i>	0	20	3.3	451	3.4	272
<i>robo, sdc / +, sdc</i>	1.1	20	72	198	-	-
<i>robo2, sdc / +, sdc</i>	3.4	20	47	187	-	-
<i>slit, sdc / +, sdc</i>	2	20	95	209	-	-
<i>robo, sdc / robo, sdc</i>	1.4	20	100 <sup>e</sup>	220	-	-
<i>robo2, sdc / robo2, sdc</i>	14	20	100 <sup>f</sup>	220	-	-

<sup>a</sup> Embryos Stadium 13-15

<sup>b</sup> Embryos Stadium 16-17, Axonbündel mit gleichem oder größerem Durchmesser als innere 1D4-gefärbte Axone

<sup>c</sup> Allele in Material und Methoden

<sup>d</sup> Mittellinie

<sup>e</sup> innere 1D4-gefärbte Axone nahezu fusioniert, äußere 1D4-gefärbte Axone größtenteils nicht betroffen

<sup>f</sup> alle 1D4-gefärbten Axone in der Mittellinie kollabiert

## 2.2 Sdc als möglicher Spieler im Slit/Robo-Signaltransduktionsweg

Slit ist ein von den Zellen der ventralen Mittellinie sezerniertes extrazelluläres Signalmolekül, welches über seine Rezeptoren Robo, Robo2 und Robo3 unter anderem die Mittellinienüberquerung migrierender Axone des Nervensystems und der Muskelvorläuferzellen verhindert (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1990). *slit*-mutante Embryonen zeigen im Nervensystem und in den Muskeln ähnliche, wenn auch weitaus stärkere Phänotypen als *sdc*-mutante Embryonen (Kidd et al., 1999). So sind mit dem 1D4-Antikörper angefärbte Axone in *slit*-mutanten Embryonen vollständig in der Mittellinie fusioniert. Nahezu alle ventralen Muskeln überqueren die Mittellinie und inserieren im gegenüberliegenden Hemisegment (Abb. 7K+L und Tab. 2).

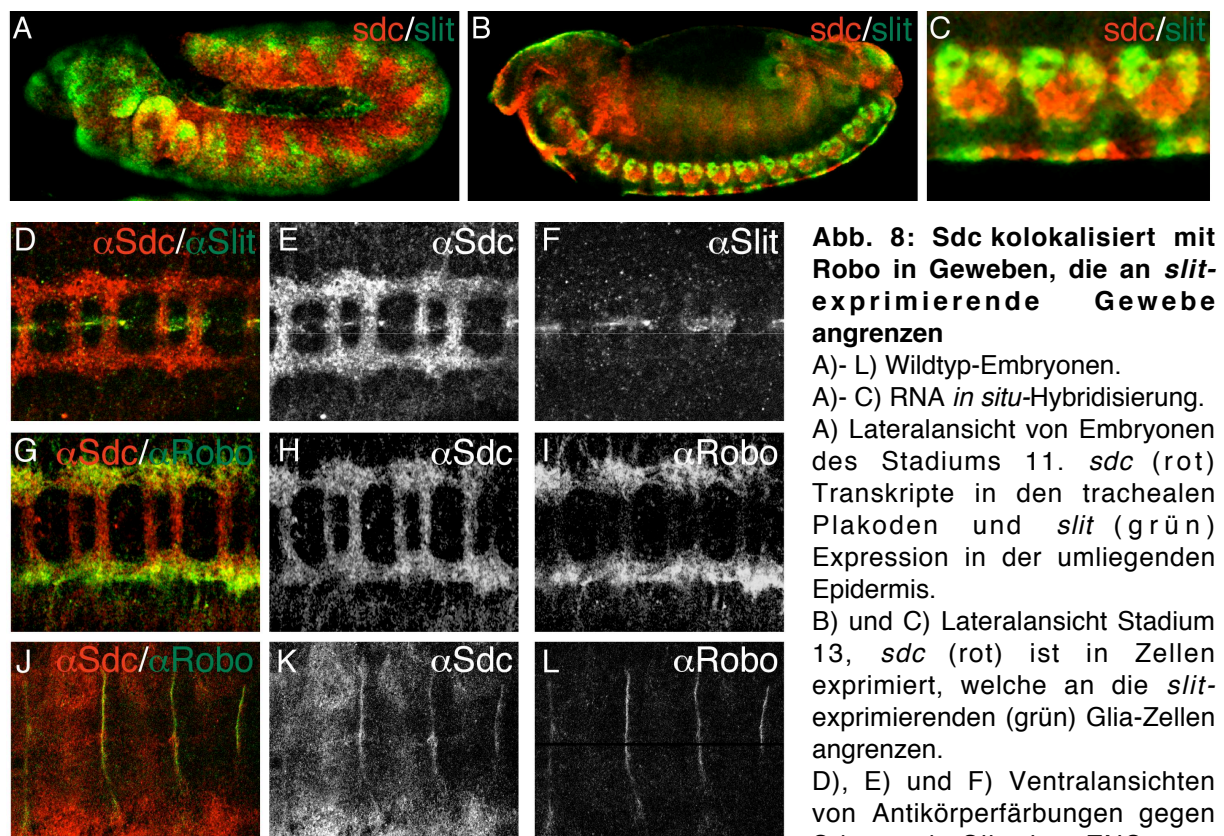
Die Analyse von Einzelmутanten und Kombinationen zwischen ihnen zeigen, dass die drei bei *Drosophila* identifizierten Robo-Rezeptoren teilweise redundante Funktionen besitzen, wobei im Nerven- und Muskelsystem hauptsächlich die Slit-Rezeptoren Robo und Robo2 an der Transduktion des Slit-Signals zur Verhinderung der Mittellinienüberquerung der Axone und Muskelvorläuferzellen beteiligt sind (Kramer et al., 2001; Rajagopalan et al., 2000a; Simpson et al., 2000b). *robo*- oder *robo2*-mutante Embryonen zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie *slit*-mutante Embryonen, allerdings in einer schwächeren Ausprägung. So überqueren in *robo2*-mutanten Embryonen lediglich einzelne ventrale Muskeln sowie in einer Minderzahl der Segmente 1D4-gefärbte Axone die Mittellinie. Somit ähnelt sowohl die Art als auch die Penetranz der Phänotypen stark denen von *sdc*-mutanten Embryonen (Abb. 7G-J und Tab. 2).

### 2.2.1 Kolokalisierung von Sdc und Robo auf den Axonen der Nervenzellen und an den Apodemen

Falls Sdc im Slit/Robo-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielt, würde man erwarten, dass *slit* und *sdc* entweder koexprimiert sind oder zumindest überlappende Expressionsdomänen aufweisen. Um dies zu prüfen, wurde eine Doppel-Floureszenz RNA *in situ*-Hybridisierung mit Sonden gegen *slit*- und *sdc*-Transkripte durchgeführt (Material & Methoden Kap. 4.1.8 und 4.2.5). Dabei zeigt sich, dass *sdc* und *slit* während der Embryogenese in mehreren Geweben in aneinander angrenzenden, nicht überlappenden Bereichen exprimiert werden (Abb. 8A-F). Dies deutet darauf hin, dass Sdc eine Funktion im Slit-Zielgewebe haben könnte.



Um eine mögliche Funktion von Sdc im Zielgewebe zu untersuchen, wurde getestet, ob Sdc mit den Slit-bindenden Robo-Rezeptoren kolokalisiert ist. Hierzu wurde eine Antikörperfärbung mit Antikörpern gegen Sdc und Robo durchgeführt (Material & Methoden Kap. 4.2.2). Da *robo* im Nervensystem in allen Slit-sensitiven Zellen exprimiert wird, während *robo2* und *robo3* in einer Subpopulation dieser Zellen exprimiert werden, sollte der Antikörper gegen Robo alle Nervenzellen anfärben, in denen Robo-Rezeptoren exprimiert sind (Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000a).



**Abb. 8: Sdc kolokalisiert mit Robo in Geweben, die an *slit*-exprimierende Gewebe angrenzen**

A)- L) Wildtyp-Embryonen.

A)- C) RNA *in situ*-Hybridisierung.

A) Lateralansicht von Embryonen des Stadiums 11. *sdc* (rot) Transkripte in den trachealen Plakoden und *slit* (grün) Expression in der umliegenden Epidermis.

B) und C) Lateralansicht Stadium 13, *sdc* (rot) ist in Zellen exprimiert, welche an die *slit*-exprimierenden (grün) Glia-Zellen angrenzen.

D), E) und F) Ventralansichten von Antikörperfärbungen gegen Sdc und Slit im ZNS von

Embryonen des Stadiums 14. Sdc kann auf allen Axonen, Slit in den Glia-Zellen der Mittellinie detektiert werden. D) Sdc in rot, Slit in grün, E) und F) einzelne Kanäle.

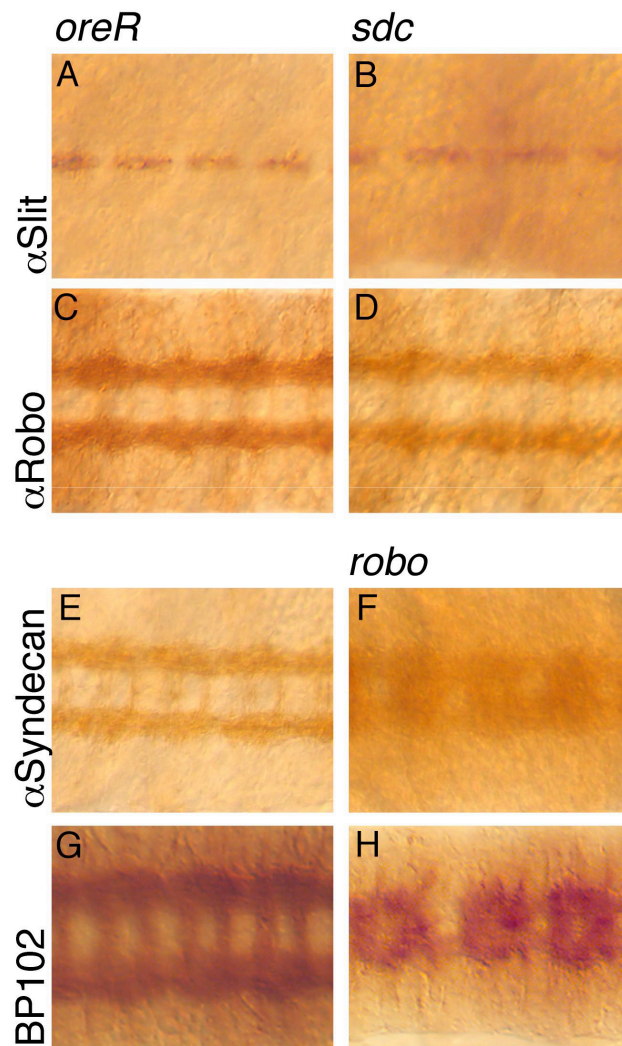
G), H) und I) Ventralansichten von Antikörperfärbungen gegen Sdc und Robo im ZNS von Embryonen des Stadiums 14. Sdc kann auf allen Axonen detektiert werden, Robo ist in den longitudinalen Axonen angereichert. G) Sdc in rot, Robo in grün, H) und I) einzelne Kanäle,

J), K) und L) Lateralansichten von Antikörperfärbungen gegen Sdc und Robo an den Apodemen von Embryonen des Stadiums 16. Sdc und Robo kolokalisieren an den Apodemen. J) Sdc in rot, Robo in grün, K) und L) einzelne Kanäle.

Der Antikörper gegen Sdc zeigt eine Akkumulation des Proteins ab dem Stadium 13 in den auswachsenden Axonen des ZNS. Sdc kann bis zum Ende der Embryogenese auf allen longitudinalen und transversalen Axonen nachgewiesen werden. Außerdem akkumuliert Sdc ab Stadium 16 an den Apodemen (Abb. 8H+K). Der Antikörper gegen Robo färbt die longitudinalen, jedoch nicht die transversalen Nervenbahnen an und weist eine Akkumulation

des Robo-Proteins an den Apodemen nach (Abb. 8I+L). Die Doppel-Antikörper-Färbung für Sdc und Robo zeigt dementsprechend deutlich die Kolo-kalisierung von Sdc und Robo an den Apodemen und an den longitudinalen, nicht jedoch an den transversalen Nervenbahnen (Abb. 8G+J). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Robo auf den transversalen Bereichen der Axone herunterreguliert wird (Keleman et al., 2002), während dies bei Sdc nicht der Fall zu sein scheint.

Sowohl die Kolo-kalisierung von Sdc mit dem Slit-Rezeptor Robo auf den longitudinalen Axonen und an den Muskelanheftungsstellen, als auch die ähnlichen Phänotypen in den Muskeln und im Nervensystem deuten auf eine Rolle von Sdc im Slit/Robo-Signalweg hin. Dabei weist die Kolo-kalisierung von Sdc mit dem Robo-Rezeptor auf eine Funktion von Sdc in den durch Slit regulierten Zellen hin. Um zu zeigen, dass die Expression oder Lokalisierung von *sdc* bzw. Sdc in den Axonen der Nervenzellen und in den Apodemen nicht von der Anwesenheit des Robo-Proteins abhängig ist, bzw. dass die Expression oder Lokalisierung von *robo* bzw. Robo nicht von Sdc kontrolliert wird, wurde eine Antikörperfärbung mit Robo- und Sdc-Antikörpern an *sdc*- bzw. *robo*-mutanten Embryonen durchgeführt (Material & Methoden Kap. 4.2.2). Diese zeigen, dass weder die Expression und die Lokalisierung von *robo* bzw. Robo in *sdc*-mutanten Embryonen, noch die Expression und Lokalisierung von *sdc* bzw. Sdc in *robo*-mutanten Embryonen verändert ist (Abb. 9). Bedingt durch das veränderte Muster des Nervensystems in *robo*-mutanten Embryonen wirkt auch die Lokalisierung von Sdc in diesen Mutanten verändert, spiegelt aber nur eine Änderung im Muster der longitudinalen Axone wider. Ein Vergleich mit einer Antikörperfärbung mit dem Antikörper BP106, der alle Axone des Nervensystems anfärbt, zeigt, dass die Lokalisierung von Sdc auf die Axone nicht verändert ist (Abb. 9E-H). Somit scheinen keine kreuzregulatorischen Effekte zwischen Sdc und Robo bei der Expression der Gene oder der Lokalisierung der Proteine vorzuliegen.



**Abb. 9: *sdc* und *robo* zeigen keine gegenseitigen kreuzregulatorischen Effekte bei der Genexpression und Lokalisation der Proteine**

A)- H) Ventralansicht von Embryonen des Stadiums 16, A), C), E), G) Wildtyp-Embryonen, B), D) *sdc*-mutante Embryonen, F), H) *robo*-mutante Embryonen.

A) und B) Die Antikörperfärbung mit einem Antikörper gegen Slit zeigt die identische Lokalisation von Slit an den Mittellinienzellen in Wildtyp- (A) und *sdc*-mutanten Embryonen (B).

C) und D) Die Antikörperfärbung mit einem Antikörper gegen Robo zeigt die identische Lokalisation von Robo auf den longitudinalen Axonen in Wildtyp- (C) und *sdc*-mutanten Embryonen (D).

E) und F) Die Antikörperfärbung mit einem Antikörper gegen Sdc zeigt die Lokalisation von Sdc auf allen Axonen in Wildtyp- und *robo*-mutanten Embryonen. Die scheinbare Veränderung der Sdc-Lokalisation in *robo*-mutanten Embryonen ist bedingt durch eine veränderte Morphologie des ZNS in diesen Mutanten. G) und H) Ein Vergleich mit einer Antikörperfärbung mit dem Antikörper BP102, der alle Axone des ZNS anfärbt, zeigt, dass Sdc in diesen Mutanten an den Axonen des ZNS lokalisiert vorliegt.

### 2.2.2 Genetische Interaktion von *sdc* mit *slit*- und *robo*-Allelen

Untersuchungen von Slit bei Vertebraten zeigten, dass Mitglieder dieser Proteinfamilie *in vitro* an HSGAG-Ketten des HSPG Glypican binden können (Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001). Zellkulturexperimente zeigten zudem, dass zelloberflächengebundene HSGAG-Ketten die Affinität von Slit zu seinem Rezeptor Robo erhöhen und die biologische Aktivität des Slit-Signals von HSGAG-Ketten abhängig ist (Hu, 2001). Diese Ergebnisse, zusammen mit den ähnlichen Phänotypen von *sdc*-, *slit*-, *robo*- und *robo2*-mutanten Embryonen sowie der Kolo-kalisierung von Sdc und Robo deuten auf eine mögliche Rolle von Sdc im Slit/Robo-Signalweg hin.

Um Indizien für eine Beteiligung von Sdc im Slit/Robo-Signalweg bei *Drosophila* zu finden, wurden genetische Interaktionsexperimente durchgeführt. Falls Sdc und Slit im gleichen Signalweg aktiv wären, würde man erwarten, dass die gleichzeitige Reduktion der

Genaktivitäten beider Gene zu einer deutlichen Verstärkung der Einzelphänotypen führen sollten.

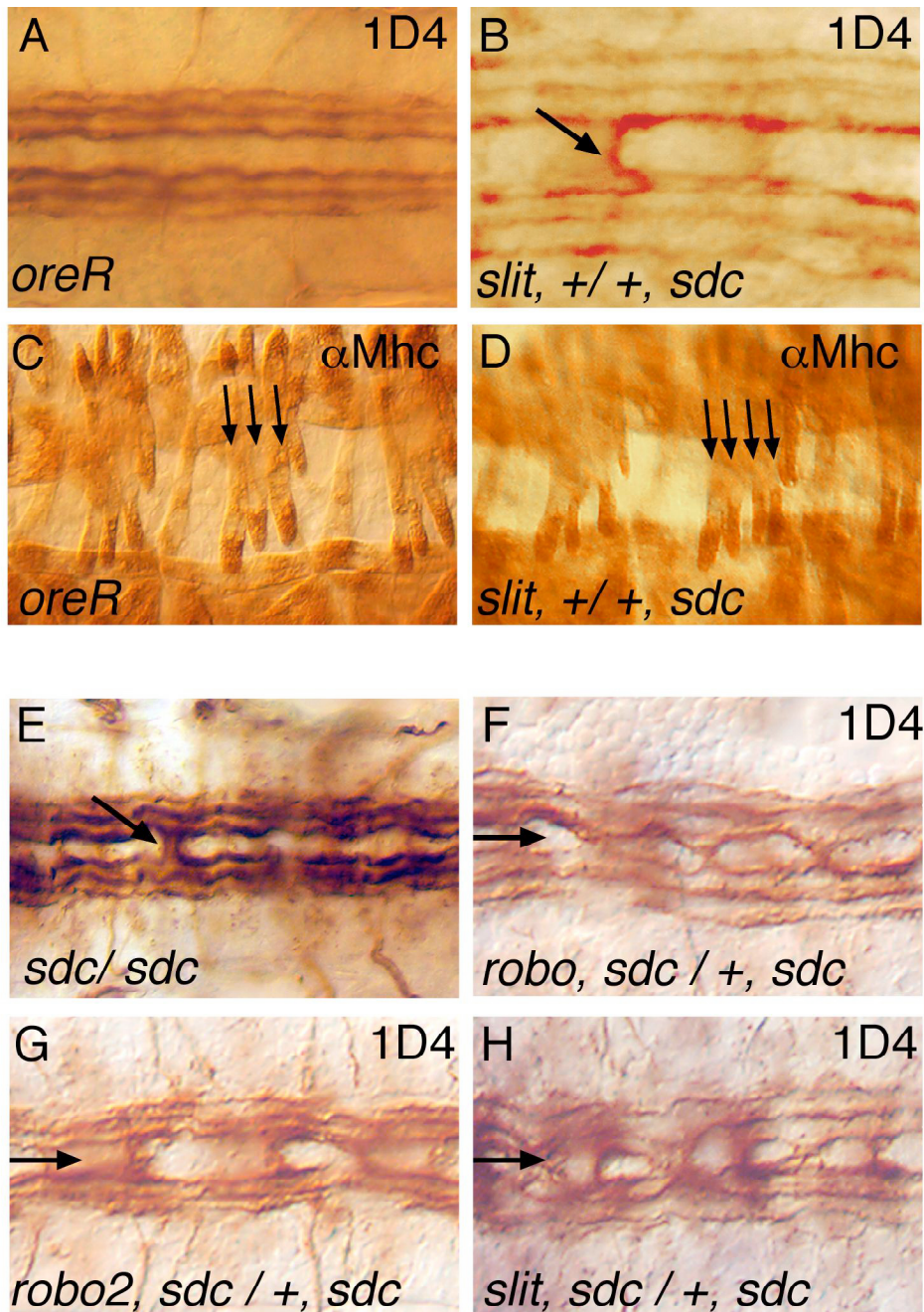
In einem ersten Experiment wurde geprüft, ob die Allele *sdc*<sup>23</sup> und *slit*<sup>2</sup> *in vivo* interagieren. Hierzu wurde untersucht, ob Embryonen, die sowohl für *sdc*<sup>23</sup> als auch für *slit*<sup>2</sup> (Material & Methoden Kap. 4.3) heterozygot sind, einen Phänotyp aufweisen, der für die beiden Gene charakteristisch ist.

Während heterozygote *sdc*-mutante Embryonen keine Phänotypen in 1D4-gefärbten Axonen des Nervensystems und keine Defekte im Muskelmuster aufweisen, zeigen heterozygote *slit*<sup>2</sup>-mutante Embryonen in 0,6% (n=462) der Segmente ein Überwachsen der inneren 1D4-gefärbten Axone und bei 1% (n=222) der Segmente einen oder mehrere zusätzliche LT Muskeln (Tabelle 2).

In transheterozygoten Embryonen, bei denen die Genaktivität von *sdc* und *slit* gleichzeitig reduziert ist, tritt eine Verstärkung dieser Phänotypen ein (Abb. 10B+D und Tab. 2): 3.3% (n=451) der Segmente zeigen innere 1D4-gefärbte Axone, die die Mittellinie überqueren sowie 3,4% (n=272) der Segmente einen oder mehrere zusätzliche LT Muskeln. In Embryonen, in denen gleichzeitig eine Kopie von *sdc* und des *slit*-Gens mutiert ist, kommt es also zu einer 5,5-fachen bzw. 3.4-fachen Verstärkung der charakteristischen Phänotypen im Vergleich zu heterozygoten *slit*-mutanten Embryonen. Diese Ergebnisse zeigen, dass *sdc* und *slit* in einem gemeinsamen genetischen Regelkreis zusammengeschlossen sind.

Um zu prüfen, ob der Phänotyp von *sdc*-mutanten Embryonen durch das Vorhandensein eines mutanten *slit*-, *robo*- oder *robo2*-Allels verstärkt werden kann, wurden *sdc*-mutante Embryonen analysiert, die jeweils heterozygot für die Allele *robo*<sup>Q1-15</sup>, *robo2*<sup>leak</sup> sowie *slit*<sup>2</sup> waren (Material & Methoden Kap. 4.3). Eine weitere Schwächung des Slit/Robo-Signalwegs durch das Vorhandensein von heterozygoten mutanten Allelen von *robo*, *robo2* bzw. *slit* in *sdc*-mutanten Embryonen bewirkt eine deutliche Verstärkung des *sdc*-Phänotyps. Während in *sdc*-mutanten Embryonen 17% (n=209) der Segmente ein Überwachsen der inneren 1D4-gefärbten Axone zeigen (Abb. 10E und Tab. 2), kann dies in 72% (n=198) der Segmente in Embryonen mit dem Genotyp *sdc*<sup>23</sup>/*sdc*<sup>23</sup>; *robo*<sup>Q1-15</sup>/+ (Abb. 10F und Tab. 2) und in 47% (n=187) der Segmente in Embryonen des Genotyps *sdc*<sup>23</sup>/*sdc*<sup>23</sup>; *robo2*<sup>leak</sup>/+ beobachtet werden (Abb. 10G und Tab. 2). Noch deutlicher treten diese Effekte in Embryonen des Genotyps *sdc*<sup>23</sup>/*sdc*<sup>23</sup>; *slit*<sup>2</sup>/+ auf, in denen 95% (n=209) der Segmente Überquerungen der inneren 1D4-gefärbten Axone zeigen (Abb. 10H und Tab. 2).





**Abb. 10: Genetische Interaktion zwischen *sdc* und *slit*, *robo* und *robo2***

A), B), E) - H) Ventrale Ansicht des embryonalen Nervensystems (1D4-Antikörper) in Embryonen des Stadiums 16 und C) und D) laterale Ansicht des embryonalen Muskelmusters (anti-MHC-Antikörper) in Embryonen des Stadiums 16.

A)- D) in *sdc*<sup>23</sup>, +/+ , *slit*<sup>2</sup> transheterozygoten Embryonen können Überquerungen der Mittellinie von inneren 1D4-gefärbten Axonen (B) sowie eine erhöhte Anzahl von LT Muskeln (D) in einigen Segmenten (im Vergleich zum Wildtyp A) und C)) beobachtet werden.

E) - H) Verstärkung des *sdc*-Phänotyps (E) im Nervensystem nach Einkreuzen jeweils eines mutanten Allels von *robo* (F), *robo2* (G) und *slit* (H) in den *sdc*-mutanten Hintergrund.



Diese Experimente zeigen eine deutliche Verstärkung der Penetranz der Phänotypen durch eine gleichzeitige Schwächung der Genaktivitäten von *sdc* und *slit* in transheterozygot mutanten Embryonen sowie eine klare Verstärkung der Phänotypen von *sdc*-mutanten Embryonen durch die zusätzliche Reduktion der Gendosis von *robo*, *robo2* oder *slit*. Diese Interaktionsstudien etablieren Sdc als eine Komponente des Slit/Robo-Signalwegs.

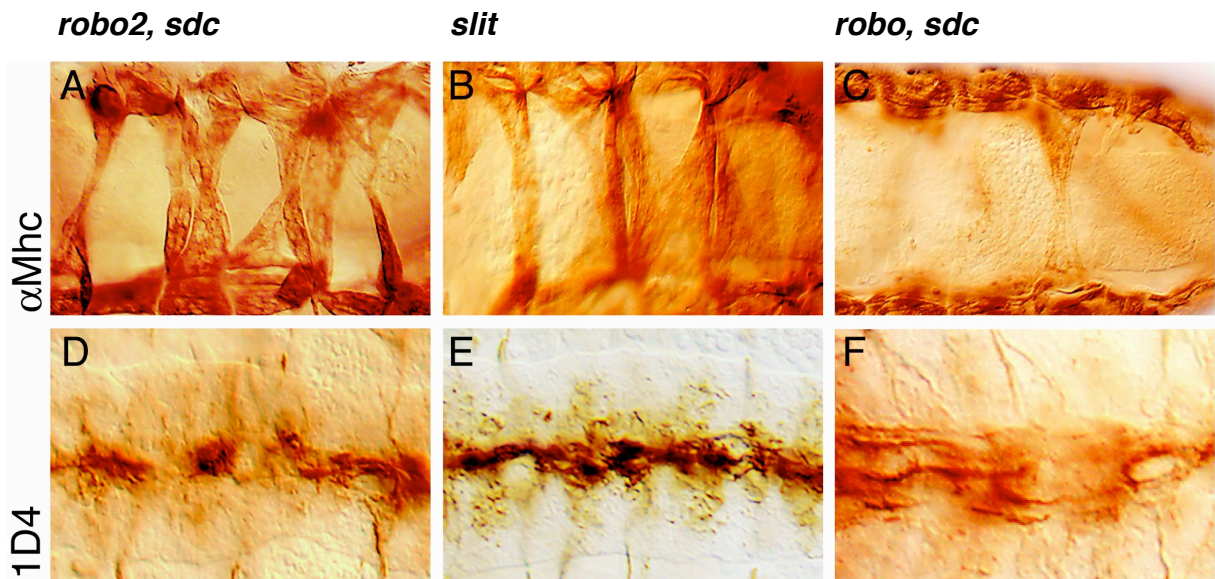
### 2.3 *sdc*, *robo*- und *sdc*, *robo2*-Doppelmutanten

Die Slit-Rezeptoren Robo und Robo2 sind während der Embryogenese an der lateralen Positionierung von Axonen und der Entscheidung beteiligt, ob Axone und Muskeln die Mittellinie überqueren oder nicht. Bei diesen Prozessen haben die beiden Rezeptoren teilweise redundante Funktionen bei der Vermittlung des Slit-Signals. Während in Embryonen, die mutant für einen der beiden Rezeptoren sind, nur einzelne Muskeln und innere 1D4-gefärbte Axone die Mittellinie überqueren, zeigen die Doppelmutanten den stärkeren *slit*-Phänotyp, bei dem fast alle ventralen Muskeln die Mittellinie überqueren und alle longitudinalen Axone in der Mittellinie fusionieren (Kramer et al., 2001; Rajagopalan et al., 2000a; Rajagopalan et al., 2000b; Simpson et al., 2000a; Simpson et al., 2000b).

Der ebenfalls relativ schwache Phänotyp von *sdc*-mutanten Embryonen könnte darauf zurückzuführen sein, dass Sdc spezifisch für einen der Robo-Rezeptoren ist. Um dies zu prüfen, wurden *sdc*, *robo*- und *sdc*, *robo2*-Doppelmutanten erstellt (Material & Methoden Kap. 4.3) und der Phänotyp im ZNS und in den Muskeln untersucht.

Damit kann überprüft werden, ob die Slit-Signaltransduktion über den nicht-mutanten Rezeptor in *sdc*-mutanten Embryonen noch funktionsfähig ist. *sdc*-, bzw. *robo2*-mutante Embryonen zeigen die Überquerungs-Phänotypen mit relativ geringer Penetranz (Abb. 7C+D+I+J und Tab.2). Sie betreffen 17% (n=209) bzw. 36% (n=198) der Segmente mit inneren 1D4-gefärbten Axonen, die die Mittellinie überqueren. Ferner findet man 1,1 (n=20) bzw. 1,6 (n=20) Muskeln pro Embryo, die die Mittellinie überqueren. *sdc*, *robo2*-doppelmutante Embryonen weisen jedoch einen Phänotyp auf, der dem von *robo*, *robo2*-doppelmutanten oder *slit*-mutanten Embryonen ähnlich ist (Abb. 11A-B+D-E und Tab. 2): alle 1D4-gefärbten Axone scheinen in der Mittellinie fusioniert zu sein (n=220) und bilden hier ein dickes Axonbündel, während durchschnittlich 14 Muskeln pro Embryo (n=20) die Mittellinie überqueren.

Im Gegensatz dazu konnte in *sdc*, *robo*-Doppelmutanten keine signifikante Verstärkung des *robo*-einzelmutilanten Phänotyps beobachtet werden (Abb. 7G+H, 11C+F und Tab. 2).



**Abb. 11: *sdc, robo2*- und *sdc, robo*-Doppelmutanten**

A) - C) Ventrale Ansicht des embryonalen Muskelusters (anti-MHC-Antikörperfärbung) in Embryonen des Stadiums 14-15 und D) - F) Ventrale Ansicht des embryonalen Nervensystems (1D4-Antikörperfärbung) in Embryonen des Stadiums 16.

A) und D) *robo2, sdc*-mutante Embryonen zeigen ein Überqueren der meisten ventralen Muskeln über die Mittellinie und einen nahezu vollständigen Kollaps aller 1D4-gefärbten Axone in die Mittellinie, Phänotypen, die denen von *slit*-Mutanten B) und E) gleichen.

C) und F) *robo, sdc*-mutante Embryonen zeigen keinen *slit*-mutanten Phänotyp.

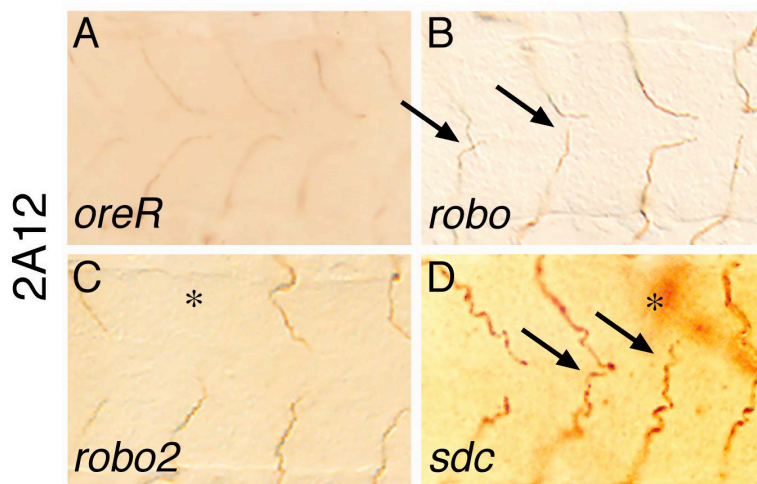
Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in *sdc, robo2*-Doppelmutanten keine oder nur wenig Slit-abhängige abstoßenden Signale über den verbliebenen Robo-Rezeptor die Rezipientenzellen erreichen, während in *sdc, robo*-Doppelmutanten der Slit/Robo-Signalweg über den Robo2-Rezeptor noch zu einem gewissen Grad aktiv bleibt. Dies bedeutet, dass Sdc ein spezifischer Kofaktor für den Robo-Rezeptor ist und/oder dass die Slit-Signaltransduktion sensibler auf eine Sdc-abhängige Reduktion der Aktivität des Slit/Robo-Signalwegs reagiert als der Robo2-Rezeptor.

### 2.3.1 Funktionen von Sdc im Tracheensystem

Um die Frage nach einer möglichen Spezifität von Sdc für einen der Robo-Rezeptoren zu testen, wurde ein weiteres Gewebe untersucht, welches der Slit/Robo-abhängigen Musterbildung unterworfen ist, das Tracheensystem. Während Robo und Robo2 im Nervensystem und im Muskelsystem ähnliche oder sogar redundante Funktionen ausüben, besitzen diese Rezeptoren bei der Entwicklung des Tracheensystems klar definierte unterschiedliche Funktionen. In einer frühen Phase der Entwicklung des Tracheensystems

erfolgt ein Slit-abhängiges Einwachsen von ventralen ganglionischen Zweigen (im Folgenden verkürzt als VGZ bezeichnet) des Tracheensystems in das ZNS. Diese anziehende Wirkung des Slit-Signals wird durch den Robo2-Rezeptor vermittelt: in *robo2*-mutanten Embryonen wachsen einige dieser VGZ nicht in das Nervensystem ein (Abb. 12C) (Englund et al., 2002). In einer späteren Phase erfolgt dann eine Robo-abhängige Abstoßung der VGZ von der *slit*-exprimierenden Mittellinie. In *robo*-Mutanten wachsen die VGZ zwar normal in das ZNS ein, werden an der Mittellinie aber nicht abgestoßen, so dass einige der VGZ über diese hinweg in das gegenüberliegende Hemisegment einwandern (Abb. 12B) (Englund et al., 2002).

Falls Sdc nur mit Robo interagieren würde, sollte in *sdc*-Mutanten nur dieser letzte Phänotyp auftreten. Dies ist aber nicht der Fall. In *sdc*-Mutanten ist eine Mischung aus beiden Phänotypen zu erkennen: einige der VGZ wachsen nicht in das ZNS ein, und andere wachsen über die Mittellinie hinaus und wandern in das gegenüberliegende Hemisegment ein (Abb. 12D).



**Abb. 12: *sdc*-Mutanten zeigen ähnliche Phänotypen wie *robo*- und *robo2*-Mutanten im Tracheensystem**

A) - D) Ventrale Ansicht der VGZ des embryonalen Tracheensystems (2A12-Antikörperfärbung) in Embryonen des Stadiums 16.

A) In Wildtyp-Embryonen wachsen alle VGZ in das ZNS ein und überwachsen die Mittellinie nicht.

B) In *robo*-mutanten Embryonen überwachsen einzelne VGZ die Mittellinie (siehe Pfeile).

C) In *robo2*-mutanten Embryonen unterbleibt das Einwachsen einiger der VGZ in das ZNS (siehe Stern).

D) In *sdc*-mutanten Embryonen kann eine Mischung aus diesen beiden Phänotypen beobachtet werden (siehe Pfeile und Stern).

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Sdc ist für die Aktivität oder Effizienz des Slit-Signals notwendig und agiert unabhängig vom jeweiligen Robo-Rezeptortyp. Dabei scheint im Nervensystem und in den Muskeln Robo sensibler auf die Reduktion der Sdc-abhängigen Slit-Aktivität zu reagieren als Robo2.

## 2.4 Gewebespezifische Normalisierungsexperimente

Slit wird von den Glia-Zellen der Mittellinie produziert, in die extrazelluläre Matrix sezerniert und gelangt über einen bisher unbekannten Mechanismus zu den Empfängerzellen, um dort an Rezeptoren der Robo-Familie zu binden (Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1988). Sdc könnte zum einen bei der Produktion oder Sezernierung oder an der proteolytischen Spaltung von Slit in den Glia-Zellen der Mittellinie beteiligt sein (Brose et al., 1999). Zum anderen könnte Sdc eine Funktion in der Diffusion oder Stabilisierung von Slit in der extrazellulären Matrix haben. Außerdem wäre es möglich, dass Sdc an den Empfängerzellen bei der Konzentration, Stabilisierung oder an einer Interaktion von Slit mit seinem Rezeptor beteiligt sein könnte. Um zu prüfen, in welchem Gewebe Sdc notwendig ist, wurden gewebespezifische Normalisierungsexperimente durchgeführt.

Hierzu wurde *sdc* mit Hilfe eines transgenen *UAS-sdc-RA*-Konstrukts (Material & Methoden Kap. 4.1.5.3, 4.1.7.1, 4.2.6, 4.3 und 4.2.3) in *sdc*-mutanten Embryonen in spezifischen Geweben exprimiert und untersucht, ob die *sdc*-Expression zur Normalisierung des mutanten Phänotyps führt. Eine gewebespezifische Normalisierung würde so den Rückschluß erlauben, in welchen Geweben Sdc in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg notwendig ist.

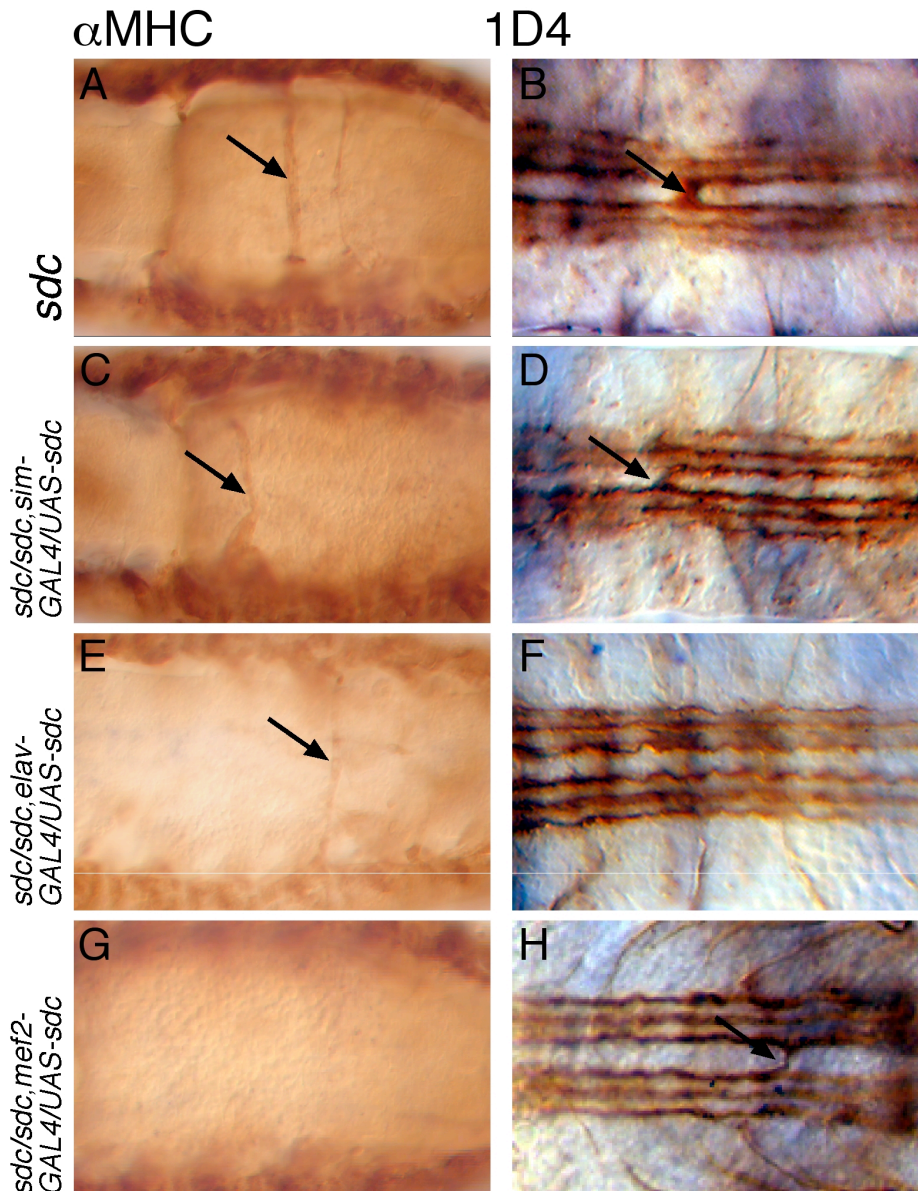
Zunächst wurde untersucht, ob Sdc in den Glia-Zellen der Mittellinie für den Slit/Robo-Signalweg notwendig ist. Zu diesem Zweck wurde das *UAS-sdc-RA*-Transgen in *sdc*-mutanten Embryonen unter Verwendung der *sim-GAL4*-Treiberlinie (Material & Methoden Kap. 4.3) in den Vorläuferzellen der ventralen Mittellinie exprimiert. Diese Zellen produzieren und sezernieren das Slit-Signal (Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Rothberg et al., 1988). Die Expression von *sdc* in diesen Zellen führt zu keiner Veränderung des *sdc*-Phänotyps im ZNS (Abb. 13C-D und Tab. 3). Sdc scheint also nicht notwendig zu sein für die Expression von *slit* und die Sezernierung des Slit-Proteins.

Sdc könnte eine alternative Funktion in der extrazellulären Matrix im Bereich zwischen den Slit-sezernierenden Zellen der Mittellinie und den Axonen bzw. den Muskeln haben. Es könnte hier beispielsweise als Faktor wirken, welcher das Slit-Signal stabilisiert, indem es durch Bindung seine Proteolyse verhindert oder für die Diffusion des Slit-Signals notwendig ist. Als eine weitere und aufgrund der Kolo-kalisierung von Sdc mit dem Robo-Rezeptor wahrscheinlichste Alternative, könnte Sdc auf den Rezipientenzellen als Korezeptor für Robo-Rezeptoren wirken und dadurch lokal das Slit-Signal stabilisieren, den Zusammenbau von Signalkomplexen ermöglichen und/oder an der Präsentation des Signals für den Robo-Rezeptor beteiligt sein.

*sdc*-mutante Embryonen, in denen das *UAS-sdc-RA*-Transgen in allen postmitotischen Neuronen unter der *elav-GAL4*-Treiberlinie (Material & Methoden Kap. 4.3) exprimiert wird, zeigen eine vollständige Normalisierung des Phänotyps im ZNS zum Wildtyp (Abb. 13B+F und Tab. 3). Während in *sdc*-mutanten Embryonen 17% (n=209) der inneren 1D4-gefärbten Axone die Mittellinie überqueren, kann dies in keinem der *sdc*-mutanten Embryonen beobachtet werden, in denen *sdc* von einem Transgen im gesamten Nervensystem exprimiert wird (n=253). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Sdc für die Funktion des Slit/Robo-Signalwegs auf der Zelloberfläche von Slit-Rezipientenzellen notwendig ist. Da aber mit Hilfe des verwendeten Treibers in diesem Experiment das *sdc*-Transgen in allen Zellen des Nervensystems exprimiert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *sdc*-exprimierende Nervenzellen in der Nachbarschaft der Slit-sezernierenden Mittellinienzellen an der Stabilisierung oder Diffusion des Signals in bzw. durch die extrazelluläre Matrix im Nervensystem beteiligt sind.

Deutlicher wird dies in gewebespezifischen Normalisierungsexperimenten in den Muskeln. Während das Slit-Signal im ZNS einen relativ kurzen Weg zurücklegen muß, liegen die Muskeln deutlich weiter von der Mittellinie entfernt. Das Slit-Signal muß daher das ZNS durchqueren, um an seinen Rezeptor an den Muskelzellen binden zu können. Um zu prüfen, ob Sdc für die Stabilisierung und/oder Diffusion des Slit-Signals über lange Wegstrecken notwendig ist oder ob Sdc tatsächlich auf den Rezipientenzellen für die Rezeption, Stabilisierung oder Präsentation des Slit-Signals erforderlich ist, wurde das *sdc*-Transgen jeweils in den Mittellinienzellen, in allen postmitotischen Neuronen des ZNS sowie in den Muskeln von *sdc*-mutanten Embryonen exprimiert und verfolgt, in welchem Gewebe Sdc für die Funktion des Slit/Robo-Signalwegs in Bezug auf die Ausbildung des Muskelmusters erforderlich ist (Abb. 13A+C+E+G und Tab. 3) (Material und Methoden Kap. 4.3.2.)





**Abb. 13: Die Expression von *sdc* im Slit-Zielgewebe ist ausreichend, den *sdc*-Phänotyp zu normalisieren**

A), C), E), G) Ventrale Ansicht des embryonalen Muskelmusters (anti-Mhc-Antikörperfärbungen) in Embryonen des Stadiums 14-15 sowie B), D), F), H) des embryonalen Nervensystems (1D4-Antikörperfärbung) in Embryonen des Stadiums 16.

A) und B) *sdc*-mutante Embryonen zeigen Überquerungen einzelner Muskeln und innerer 1D4-gefärbter Axone über die Mittellinie (siehe Pfeile).

C) und D) *sdc*-mutante Embryonen, in denen *sdc* in der Mittellinie exprimiert wird, zeigen den *sdc*-Phänotyp (siehe Pfeile).

E) und F) *sdc*-mutante Embryonen, in denen *sdc* in allen postmitotischen Zellen des Nervensystems exprimiert wird, zeigen eine Normalisierung des *sdc*-Phänotyps im Nervensystem, jedoch nicht in den Muskeln (siehe Pfeil in E).

G) und H) *sdc*-mutante Embryonen, in denen *sdc* in den Muskeln exprimiert wird, zeigen eine Normalisierung des *sdc*-Phänotyps in den Muskeln, jedoch nicht im Nervensystem (siehe Pfeil in H).

Während in *sdc*-mutanten Embryonen durchschnittlich 1,2 (n=21) Muskeln pro Embryo die Mittellinie dorsal des ZNS überqueren, ist die Expression von *sdc* weder in der Mittellinie noch in allen postmitotischen Neuronen ausreichend, um den *sdc*-Phänotyp in den Muskeln zu normalisieren. In diesen *sdc*-mutanten Embryonen sind durchschnittlich 1,1 (n=20) (Expression von *sdc* mit dem Mittellinientreiber *sim-GAL4* (Material & Methoden Kap 4.3)) bzw. 0,9 (n=38) (Expression von *sdc* mit einem Treiber in allen postmitotischen Neuronen, *elav-GAL4* (Material & Methoden Kap 4.3)) Muskeln pro Embryo zu finden, welche die Mittellinie überqueren. Wird *sdc* jedoch in den Muskeln mit dem Muskel-spezifischen Treiber *mef2-GAL4* (Material & Methoden Kap 4.3) in *sdc*-mutanten Embryonen exprimiert, kann eine Normalisierung des *sdc*-Phänotyps in den Muskeln zum Wildtyp beobachtet werden (n=37).

Diese Experimente zeigen, dass Sdc in den Slit-rezipienten-Zellen, also dem Gewebe, welches auch den Robo-Rezeptor exprimiert, ausreichend ist, um die volle Funktion des Slit/Robo-Signalwegs wiederherzustellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass Sdc an der Zelloberfläche der Slit-rezipienten-Zellen bei der Konzentration, Stabilisierung oder Präsentation des Slit-Signals eine Rolle spielen könnte. Außerdem könnte es an der Bildung oder Stabilisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes beteiligt sein, während eine Stabilisierung oder Diffusion des Slit-Signals durch die extrazelluläre Matrix nicht von Sdc abhängt.

**Tab. 3: Gewebespezifische Normalisierungsexperimente**

Genotyp <sup>c</sup>	ML <sup>d</sup> -Überquerungen von Muskeln/Embryo <sup>a</sup>	Anzahl der untersuchten Embryonen	Überquerungen der ML <sup>d</sup> von inneren 1D4-gefärbten Axonen (%) <sup>b</sup>	Anzahl der untersuchten Segmente
<i>sdc/sdc</i>	1.2	21	17	209
<i>sdc/sdc;UAS-sdc/sim-GAL4</i>	1.1	20	19	198
<i>sdc/sdc;UAS-sdc/elav-GAL4</i>	0.9	38	0	253
<i>sdc/sdc;UAS-sdc/mef2-GAL4</i>	0.03	37	17	132

<sup>a</sup> Embryonen Stadium 13-15

<sup>b</sup> Embryonen Stadium 16-17, Axonbündel mit gleichem oder größerem Durchmesser als innere 1D4-gefärbte Axone

<sup>c</sup> Allele in Material und Methoden

<sup>d</sup> Mittellinie

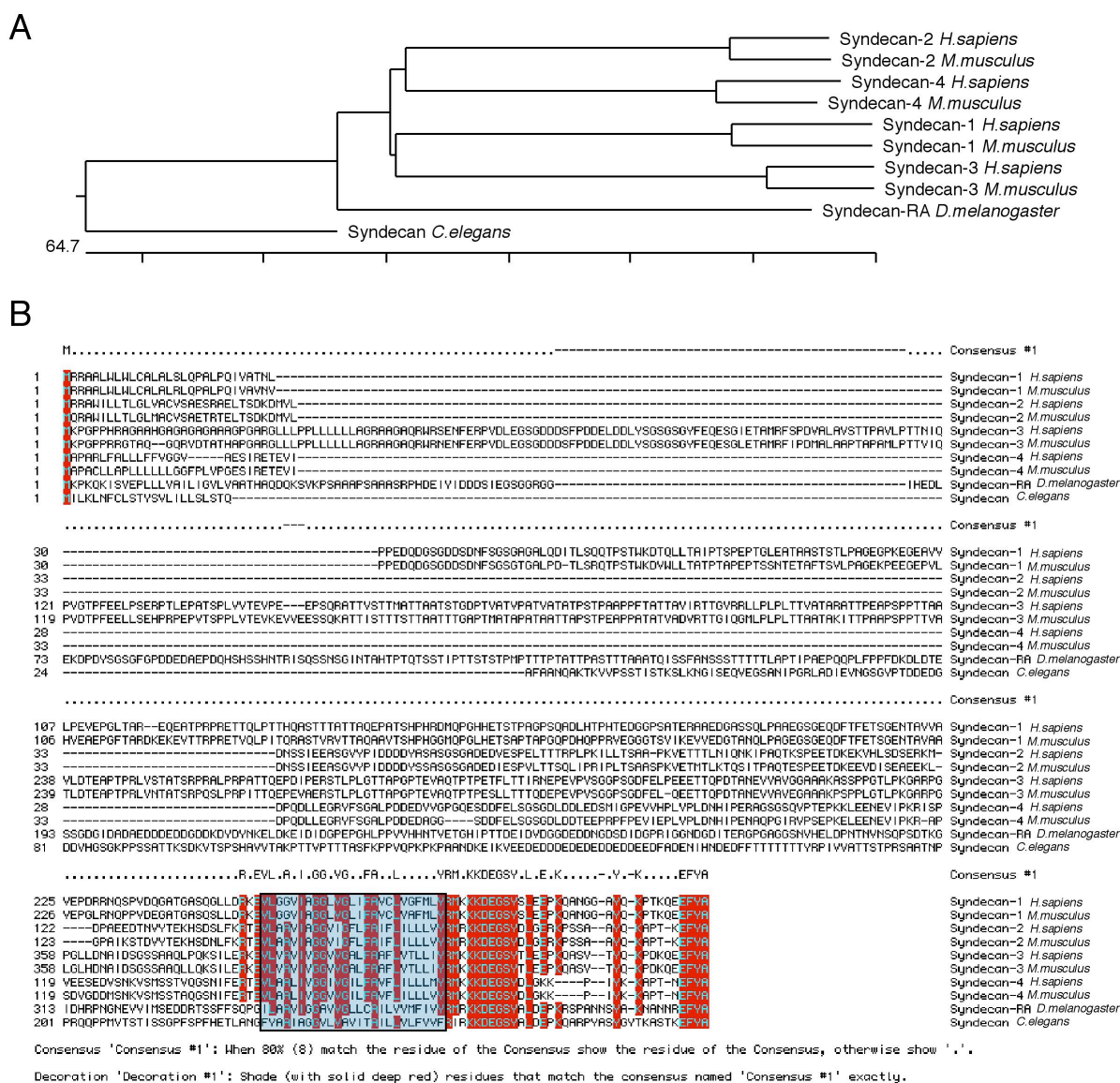
## 2.5 Die Sdc-Proteinfamilie bei Vertebraten und Invertebraten zeigt einen hohen Grad an Konservierung in ihrer carboxyterminalen Region

Mitglieder der Sdc-Proteinfamilie sind bei verschiedenen Organismen vom Nematoden *C.elegans* bis zum Menschen hin bekannt. Während *Drosophila* und *C.elegans* jeweils ein *sdc*-Gen aufweisen, konnten bei der Maus und im Menschen jeweils vier *sdc*-homologe Gene identifiziert werden: *sdc1*- 4, wobei Sdc1 und Sdc3 sowie Sdc2 und Sdc4 zwei Subfamilien bilden (Abb. 14A) (Couchman, 2003; Spring et al., 1994).

Syndecane sind Typ-I Membranproteine mit einem unterschiedlich langen extrazellulären Bereich mit 3-8 HSGAG-Ketten, einer Transmembrandomäne und einer relativ kurzen cytoplasmatischen Region am carboxyterminalen Ende. Die drei *Drosophila sdc*-Transkripte kodieren für zwei Proteinvarianten, welche sich in der Länge ihrer extrazellulären Domänen und der Anzahl ihrer putativen HSGAG-Bindestellen unterscheiden. Beide Varianten haben eine identische Transmembrandomäne, auf die ein kurzer 35 Aminosäuren langer cytoplasmatischer Bereich folgt (Abb. 5).

Während die extrazelluläre Domäne in der Sdc-Proteinfamilie relativ geringe Sequenzkonservierung zwischen den Proteinen bei Invertebraten und Vertebraten bzw. zwischen den vertebraten Subfamilien aufweist, zeigen die Transmembrandomänen und die cytoplasmatischen Regionen im Sequenzvergleich hohe Konservierung zwischen den Organismen. Vor allem zwei Aminosäurereste in der Transmembrandomäne sowie acht membran-proximale und die carboxyterminalen vier Aminosäurereste im cytoplasmatischen Bereich weisen vollständige Konservierung in allen analysierten Sdc-Proteinen auf (Abb. 14B) (Spring et al., 1994).





#### Abb.14: Vertebraten- und Invertebraten-Sdc

A) Der phylogenetische Stammbaum zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Vertebraten-Sdc 1-4 der Maus und dem Menschen sowie dem *Drosophila*-Sdc (SdcRA) und dem *C.elegans*-Sdc.

B) zeigt den Sequenzvergleich von *Drosophila*-Sdc mit Sdc 1-4 der Maus und dem Menschen sowie dem *C.elegans*-Sdc. Während die N-terminale, extrazelluläre Domäne dieser Proteine über die Speziesgrenzen hinweg keinerlei Sequenzhomologie aufweist, zeigt sowohl die Transmembran (blaue Box) wie auch die cytoplasmatische Region einen hohen Grad an Sequenzkonservierung. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm MegAlign (DNA Star) und der ClustalW Methode durchgeführt.

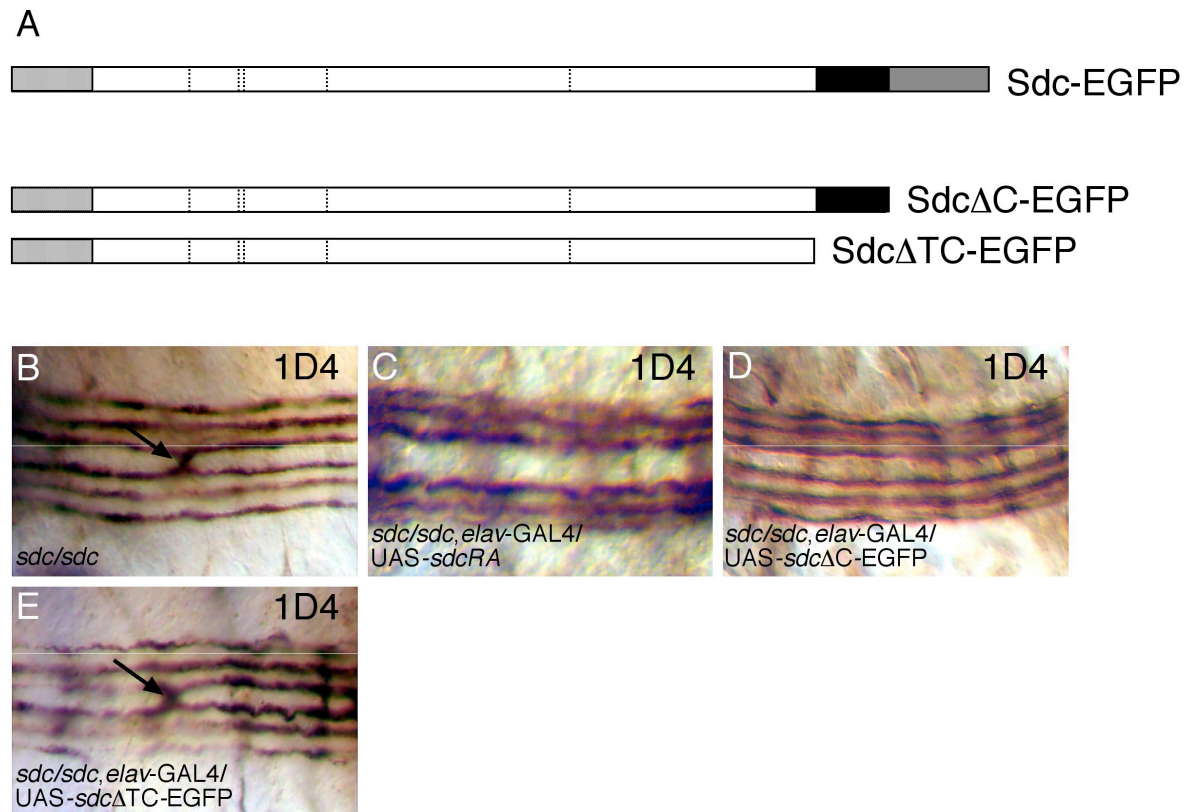
#### 2.5.1 Sdc-Deletionsproteine

Die hohe Konservierung der Transmembrandomäne sowie der carboxyterminalen Region von Sdc weisen auf eine funktionelle Konservierung dieser Bereiche des Proteins hin. Um zu prüfen, ob einzelne dieser in den beiden *Drosophila* Sdc-Varianten konservierten Bereiche für

die Funktion von Sdc in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg essentiell sind, wurden zwei *UAS*-Konstrukte hergestellt, in denen die gesamte cytoplasmatische Region (*UAS-sdc*ΔC), bzw. die cytoplasmatische Region als auch die Transmembrandomäne deletiert worden ist (*UAS-sdc*ΔTC) (Material & Methoden Kap. 4.1.5.3, 4.1.7.1 und 4.2.6). Da der Sdc-Antikörper gegen ein Epitop in der carboxyterminalen Region gerichtet ist (Material & Methoden Kap. 4.2.3), wurde, um die Expression dieser Deletionskonstrukte *in vivo* verfolgen zu können, an das 3' Ende dieser Konstrukte die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein („green fluorescent protein“ (EGFP)) fusioniert (Abb. 15A und Material & Methoden 4.1.7.1).

Nach der Etablierung einzelner Fliegenlinien wurde die Fähigkeit dieser Deletionskonstrukte getestet, den neuronalen Phänotyp in *sdc*-mutanten Embryonen zu normalisieren. Zu diesem Zweck wurden einzelne transgene Insertionen in *sdc*-Mutanten gekreuzt (Material & Methoden Kap. 4.3) und mit Hilfe des *elav-GAL4*-Treibers (Material & Methoden Kap. 4.3) in allen postmitotischen Neuronen exprimiert.

In *sdc*-mutanten Embryonen erfolgt in 17% (n=209) der Segmente ein Überwachsen der inneren 1D4-gefärbten Axone (Abb. 15B und Tab. 4). Dieser Phänotyp kann durch die Expression eines *UAS-sdc-RA*-transgenen Konstrukts im ZNS nahezu komplett normalisiert werden (n=198) (Abb. 15C und Tab. 4). Ähnlich verhält es sich mit dem *UAS-sdc*ΔC-Deletionskonstrukt. Die panneurale Expression einer Sdc-Variante ohne cytoplasmatische Domäne zeigt eine nahezu vollständige Normalisierung des *sdc*-Phänotyps im Nervensystem (n=220) (Abb. 15D und Tab. 4). Dies bedeutet, dass der hochkonservierte cytoplasmatische Bereich von Sdc nicht notwendig für die Funktion von Sdc in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg ist. Demgegenüber zeigt die Expression des *UAS-sdc*ΔTC-Deletionskonstrukts, in dem die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Region deletiert sind, keine Normalisierung des *sdc*-Phänotyps (n=209) (Abb. 15E und Tab. 4). Eine Sdc-Proteinvariante, die nicht mehr membrangebunden ist, ist nicht mehr in der Lage, den *sdc*-Phänotyp zu normalisieren.



**Abb. 15.: Untersuchung der Aktivität von Sdc C-terminalen Deletionsproteinen**

In A) sind die verwendeten Deletionskonstrukte schematisch dargestellt, die Signalsequenzen sind gepunktet, die Transmembrandomäne schwarz und die cytoplasmatische Domäne grau dargestellt.

B) - E) Ventrale Ansicht des embryonalen Nervensystems (1D4-Antikörperfärbungen) in Embryonen des Stadiums 16.

B) Während in *sdcsdc*-mutanten Embryonen vereinzelte innere 1D4-gefärbte Axone die Mittellinie überqueren (siehe Pfeil),

C) zeigt sich in *sdcsdc*-mutanten Embryonen, in denen das *UAS-sdc-RA-EGFP*- oder das *UAS-sdcΔC-EGFP*-Transgen im Nervensystem mit dem *elav-GAL4*-Treiber überexprimiert wird, eine fast vollständige Normalisierung des Phänotyps zum Wildtyp.

E) Die Expression eines *UAS-sdcΔTC-EGFP*-Transgens im Nervensystem von *sdcsdc*-mutanten Embryonen bewirkt keine Veränderung des *sdcsdc*-Phänotyps.

Zusammengefasst zeigt sich, dass die cytoplasmatische Region für die Funktion des Sdc-Proteins in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg nicht essentiell ist. Dagegen scheint die Transmembrandomäne bzw. die Lokalisierung des Proteins an der Zelloberfläche notwendig für die Funktion von Sdc zu sein. Eine cytoplasmatische Signalfunktion von Sdc in Bezug auf eine Slit/Robo-Signalvermittlung ist daher ausgeschlossen.

**Tab. 4: Normalisierungsexperimente mit Sdc-Deletionsproteinen**

Genotyp <sup>b</sup>	Überquerungen der ML <sup>c</sup> von inneren 1D4- gefärbten Axonen (%) <sup>a</sup>	Anzahl der untersuchten Segmente
<i>sdC/sdC</i>	17	209
<i>sdC/sdC;UAS-sdC/elav-GAL4</i>	0,5	198
<i>sdC/sdC;UAS-sdC<math>\square</math>C/elav-GAL4</i>	1	220
<i>sdC/sdC;UAS-sdC<math>\square</math>TC/elav-GAL4</i>	22	209

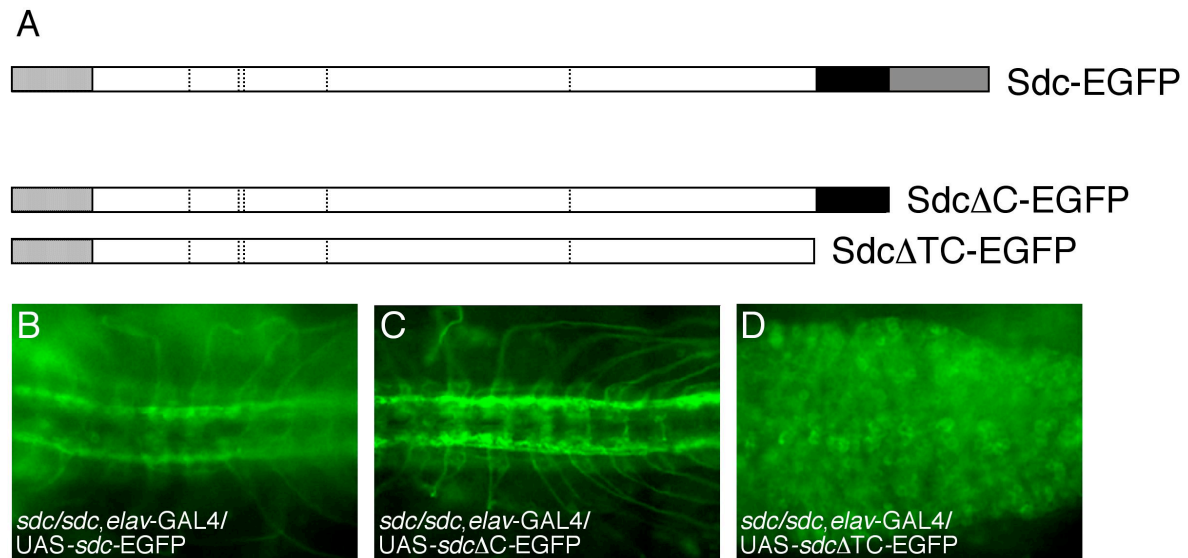
<sup>a</sup> Embryonen Stadium 16-17, Axonbündel mit gleichem oder größerem Durchmesser als innere 1D4-gefärbte Axone  
<sup>b</sup> Allele in Material und Methoden  
<sup>c</sup> Mittellinie

## 2.5.2 Subzelluläre Lokalisierung der Sdc-Deletionsproteine

Antikörperfärbungen in Stadium 15-17 Embryonen zeigen die Lokalisierung von Sdc in den Axonen der Nervenzellen und den Apodemen (Abb. 8H+K). Eine spezifische subzelluläre Lokalisierung konnte auch für die vertebraten Sdc-Proteine nachgewiesen werden. So lokalisiert beispielsweise Sdc2 in die dendritischen Dornfortsätze („dendritic spines“) (Ethell and Yamaguchi, 1999), und Sdc4 ist in fokalen Adhäsionen („focal adhesions“) angereichert (Woods and Couchman, 1994).

Um zu prüfen, ob die cytoplasmatische Region von Sdc für die spezifische Lokalisierung des Sdc-Proteins notwendig ist, wurde die subzelluläre Lokalisierung eines Sdc-EGFP-Fusionsproteins (Material & Methoden Kap. 4.1.5.3, 4.1.7.1 und 4.2.6.) mit den Sdc-Deletionsproteinen Sdc $\square$ C-EGFP und Sdc $\square$ TC-EGFP (s.o.) in transgenen Fliegen verglichen (Abb. 16A). Um auszuschließen, dass die Deletionsproteine über mögliche Dimerisierung oder Oligomerisierung mit endogenem Sdc eine veränderte Lokalisierung erhalten, wurden die Deletionskonstrukte in *sdC*-mutanten Embryonen unter Verwendung des *elav-GAL4*-Treibers in allen postmitotischen Nervenzellen exprimiert. Die panneurale Überexpression des *UAS-sdC-EGFP*-Fusionskonstrukts resultierte in einer Akkumulation des GFP-Signals in den Axonen der Nervenzellen (Abb. 16B). Ein ähnliches Bild konnte auch nach der Überexpression des *sdC $\square$ C*-Deletionskonstrukts beobachtet werden. Auch hier ist eine starke Akkumulation des GFP-Signals auf den Axonen der Nervenzellen zu beobachten (Abb. 16C). Bei der Expression beider Konstrukte konnte nur ein schwaches Signal auf den Zellkörpern der Nervenzellen detektiert werden (Abb. 16B+C). Dies deutet darauf hin, dass die cytoplasmatische Region für die Lokalisierung des Sdc-GFP-Fusionsproteins in die Axone der Nervenzellen nicht essentiell ist. Im Gegensatz dazu führt die Expression des *sdC $\square$ TC*-

Deletionskonstrukts zu einer diffusen ubiquitären Färbung im Bereich der Zellkörper der Nervenzellen (Abb. 17D).



**Abb. 16: Expressionskontrolle der Deletionskonstrukte und Lokalisation der Sdc-Deletionsproteine**

In A) sind die verwendeten Deletionskonstrukte schematisch dargestellt, die Signalsequenzen sind gepunktet, die Transmembrandomäne schwarz und die cytoplasmatische Domäne grau dargestellt.

B) - D) Ventrale Ansicht von L1-Larven. Gezeigt ist die EGFP-Autofluoreszenz der C-terminal mit EGFP fusionierten (Deletions-)proteine. In allen Larven kann ein starkes GFP-Signal der Fusionsproteine beobachtet werden.

B) Während die Sdc-EGFP und

C) Sdc $\Delta$ C-EGFP-Fusionsproteine auf die Axone der Nervenzellen lokalisieren,

D) weist das Sdc $\Delta$ TC-EGFP-Fusionsprotein keine Lokalisation auf die Axone der Nervenzellen auf.

Die Transmembrandomäne und/oder die Verankerung des Proteins in der Zellmembran ist also essentiell für die Lokalisierung des Proteins an den Axonen der Nervenzellen.

Dagegen ist die cytoplasmatische Region von Sdc weder für die subzelluläre Lokalisierung des Proteins noch für seine Funktion in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg notwendig. Die panneurale Expression der zelloberflächenlokalisierten Form von Sdc ist ausreichend, um den *sdc*-Phänotyp zu normalisieren.

## 2.6 Spezifität von Sdc in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg

Sdc ist ein HSPG und trägt in seiner extrazellulären Domäne vier bzw. fünf Serin-Reste, an die HSGAG kovalent gebunden werden (Abb. 5B)(Spring et al., 1994). Es wäre also möglich, dass die Hauptfunktion von Sdc darin bestehen könnte, ein Proteingerüst zu bilden, an dem HSGAG-Ketten an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dieses Modell ist konsistent mit den Ergebnissen, dass die Expression einer Sdc-Variante, die lediglich aus der extrazellulären

Domäne und der Transmembrandomäne besteht, den *sdc*-Phänotyp normalisieren kann. Ferner deuten vorläufige Ergebnisse darauf hin, dass zygotische Mutanten für *sugarless* (kodierend für die UDP-Glukose Dehydrogenase, die einen Zuckerbaustein für die HSGAG-Ketten bereitstellt, siehe Einleitung) und *tout-velu* (kodierend für eine HSGAG-Polymerase, siehe Einleitung) (Allele in Material & Methoden Kap. 4.3) *sdc*-mutanten-ähnliche Defekte in der Migration der Axone des ZNS aufweisen, was die generelle Bedeutung der HSGAG-Ketten für den Slit/Robo-Signalweg unterstreicht.

Falls allein das Tragen von HSGAG-Ketten die Sdc-Funktion ausmacht, dann könnten auch andere zelloberflächengebundene HSPG Sdc-analoge Funktion zeigen. Dies würde den Befund erklären, warum *sdc*-Mutanten einen schwächer ausgeprägten Phänotyp zeigen als *slit*-Mutanten. Um zu prüfen, ob auch andere HSPG eine Rolle im Slit/Robo-Signalweg spielen, wurde mit diesen eine Mutantenanalyse durchgeführt (Allele in Material & Methoden Kap. 4.3).

Weder *dally*-mutante noch *trol*-mutante noch *dally*, *dlp*-doppelmutante Embryonen zeigen jedoch Slit/Robo-ähnliche Defekte im ZNS und in den Muskeln (Tab. 5).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass Sdc entweder das spezifische HSPG für den Slit/Robo-Signalweg ist oder aber ein HSPG darstellt, welches den Hauptanteil der im Slit/Robo-Signalweg aktiven HSGAG-Ketten auf der Zelloberfläche präsentiert. Aufgrund der maternalen Expression dieser Gene kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere HSPG, wenn auch in geringerem Maße, im Slit/Robo-Signalweg eine aktive Rolle spielen (siehe Diskussion).

**Tab. 5: Spezifität von Sdc im Slit/Robo-Signalweg**

Genotyp	Überquerungen der ML <sup>b</sup> von inneren 1D4- gefärbten Axonen (%) <sup>a</sup>	Anzahl der untersuchten Segmente
<i>dally</i> <sup>ΔP-527</sup> / <i>dally</i> <sup>ΔP-527</sup>	0	198
<i>troP<sup>null</sup></i>	0	209
<i>dally</i> <sup>80</sup> , <i>dlp</i> <sup>A187</sup> / <i>dally</i> <sup>80</sup> , <i>dlp</i> <sup>A187</sup>	0	165
<i>sdc</i> <sup>23</sup> / <i>sdc</i> <sup>23</sup>	17	209
<i>sdc</i> <sup>23</sup> / <i>sdc</i> <sup>23</sup> ;UAS- <i>dlp</i> /elav-GAL4	9	198

<sup>a</sup> Embryonen Stadium 16-17, Axonbündel mit gleichem oder größerem Durchmesser als innere 1D4-gefärbte Axone

<sup>b</sup> Mittellinie

Um zu prüfen, ob allein die Erhöhung der Konzentration von HSGAG-Ketten im ZNS ausreicht, um den *sdc*-Phänotyp zu normalisieren, wurde das Glypikan Dlp, welches über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert ist und ebenfalls eine endogene Expression

im ZNS aufweist (Khare and Baumgartner, 2000), im Nervensystem von *sdc*-mutanten Embryonen exprimiert.

Die Expression des *UAS-dlp*-Transgens mit Hilfe des *elav-GAL4*-Treibers im Nervensystem *sdc*-mutanter Embryonen (Material & Methoden Kap. 4.3) führt zu einer Abschwächung des *sdc*-Phänotyps. Während in *sdc*-mutanten Embryonen 17% (n=209) (Tab. 5) der Segmente des Stadiums 17 ein Überwachsen innerer 1D4-gefärbter Axone über die Mittellinie zeigen, führt die Expression von *dlp* im ZNS *sdc*-mutanter Embryonen zu einer Reduktion der Migrationsdefekte bei Axonen auf 9% (n=198) (Tab. 5, siehe auch (Johnson et al., 2004)). Eine Erhöhung der Anzahl der membranständigen HSGAG-Ketten in *sdc*-mutanten Embryonen, unabhängig vom HSPG-Proteingerüst, bewirkt also eine teilweise Normalisierung des *sdc*-Phänotyps.

Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der HSGAG-Ketten, unabhängig vom HSPG-Proteingerüst, für den Slit/Robo-Signalweg: die Erhöhung der HSGAG-Dichte im Nervensystem mildert den *sdc*-Phänotyp. Zum anderen zeigt die Beobachtung aber auch, dass die quantitative Erhöhung der HSGAG-Dichte alleine, zumindest in diesem Experiment, nicht ausreichend ist, um den *sdc*-Phänotyp vollständig zu normalisieren.

Die partielle Normalisierung kann mit zwei Modellen erklärt werden: einem "quantitativen" und einem "qualitativen". Das "quantitative" erklärt die teilweise Normalisierung dadurch, dass für den Slit/Robo-Signalweg eine bestimmte Konzentration an HSGAG-Ketten auf dem Rezipientengewebe vorhanden sein muß, um eine optimale Signalweiterleitung zu gewährleisten. Die Expression von *dlp* im Nervensystem stellt zwar keine genügend hohe Konzentration an HSGAG-Ketten bereit, sie reicht aber aus, um den *sdc*-Phänotyp abzumildern (siehe Diskussion). Dieses Modell impliziert, dass die Funktion der HSPG ausschließlich darin besteht, auf der Zelloberfläche HSGAG-Ketten zu präsentieren, ohne spezifische Funktionen zu haben.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bietet das "qualitative" Modell. Dieses beinhaltet, dass die HSPG-Proteingerüste Informationen tragen, die ihre Affinität und/oder die ihrer HSGAG-Ketten für bestimmte extrazelluläre Signalwege erhöhen. Diese Information könnte zum einen ein unterschiedlicher, über die Transmembrandomäne erfolgender Di- oder Oligomerstatus (Asundi and Carey, 1995) oder eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisierung in bestimmten Organellen/Strukturen oder in Mikrodomänen sein (Ethell and Yamaguchi, 1999; Woods and Couchman, 1994). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die HSGAG-Ketten von Sdc durch spezifische sekundäre Modifizierungen (siehe Einleitung) eine höhere Affinität zu Slit haben, als die HSGAG-Ketten anderer HSPG.

Die partielle Normalisierung durch die Expression von *dlp* im Nervensystem *sdc*-mutanter Embryonen würde nach dem "qualitativen Modell" aufgrund der generellen Affinität von Slit zu negativ geladenen HSGAG-Ketten erfolgen (Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001), für die optimale Transduktion des Slit-Signals wäre aber eine spezifische Bindung an das HSPG Sdc erforderlich.

Untersuchungen an HSGAG-modifizierenden Enzymen bei *Drosophila* und *C.elegans* zeigen, dass sekundäre Modifizierungen die Spezifität der HSGAG-Ketten bestimmen. Diese HSGAG-modifizierenden Enzyme sulfatieren einzelne Zuckerreste der HSGAG-Ketten an spezifischen Sauerstoffresten und beeinflussen dadurch die Spezifität der Bindung der HSGAG für einzelne Liganden. So konnte bei *Drosophila* mit Hilfe von RNAi- (RNA-Interferenz) Experimenten gezeigt werden, dass für den FGF-Signalweg die Aktivität des Enzyms Hs6Ost (Heparansulfat 6-O sulfotransferase) (Kamimura et al., 2001) und für die Aktivität des Notch-Signalwegs das Enzym Hs3Ost-B (Heparansulfat 3-O sulfotransferase) notwendig ist (Kamimura et al., 2004). Interessanterweise konnte zudem beim Nematoden *C.elegans* gezeigt werden, dass Individuen mit Mutationen in den Genen, die für die Hs2Ost und der Hs6Ost kodieren, Störungen im Slit/Robo-Signalweg an der Mittellinie aufweisen (Bulow and Hobert, 2004). Zusammen mit der Beobachtung, dass die Epimerisation von Galaktosaminoglykanen, einer anderen Klasse von Glykosaminoglykanen, abhängig vom Proteingerüst erfolgt (Seidler et al., 2002) und dass die HSGAG-Ketten von Sdc und Glypican aus denselben Zellen leichte Unterschiede in ihren Modifizierungen aufweisen (Tumova et al., 2000), ergibt sich also die Möglichkeit, dass die HSGAG-Ketten der HSPG abhängig vom Proteingerüst modifiziert werden und somit spezifische Modifizierungen der HSGAG-Ketten von Sdc die Affinität der Ketten für das Slit-Signal erhöhen könnten.

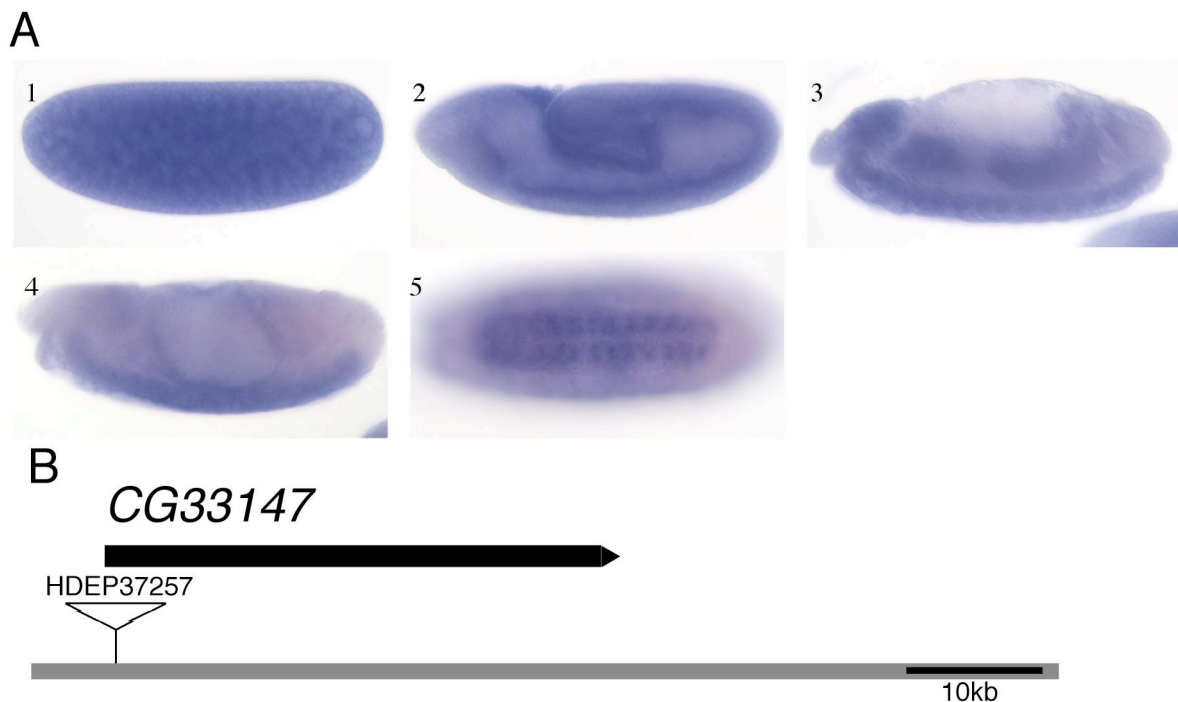
Das Gen für das Enzym Hs6Ost, welches eine Rolle im FGF-Signalweg spielt, wird zygotisch spezifisch im Tracheensystem exprimiert (Kamimura et al., 2001). Diese Spezifität der Expression eines HSGAG-modifizierenden Enzyms deutet eine weitere Ebene der Spezifität der HSGAG-vermittelten Signalweitergabe an. Eine gewebespezifische Modifizierung von HSGAG könnte räumlich und zeitlich unterschiedlich einen oder mehrere Signalwege beeinflussen. Es ergibt sich also die Möglichkeit, dass diese HSGAG-modifizierenden Enzyme eine spezifische Expression aufweisen, die Rückschlüsse auf ihre Funktionen erlauben könnte.

Um ein möglicherweise für den Slit/Robo-Signalweg spezifisches HSGAG-modifizierendes Enzym zu identifizieren, wurde die Expression von Genen, deren Produkte an der



Modifizierung von HSGAG-Ketten beteiligt sind mit Hilfe von RNA *in situ*-Hybridisierung mit verschiedenen Transkriptproben (Material & Methoden Kap. 4.2.1, 4.2.4 und 4.1.8) an Embryonen bestimmt. Ziel war es, ein Gen für ein HSGAG-modifizierendes Enzym zu identifizieren, welches spezifisch in den Geweben exprimiert wird, die Slit/Robo-abhängige Migrationsprozesse durchlaufen.

Die RNA *in situ*-Hybridisierungen mit Sonden gegen die Transkripte der Gene der C5-Epimerase, der Hs2Ost, der Hs6Ost und der Hs3Ost-A zeigten, dass nur zwei der untersuchten Gene ein gewebespezifisches Expressionsmuster aufweisen. Während die Gene für die C5-epimerase und die Hs2Ost eine maternale Expression zeigen und bis zum Stadium 12 schwach ubiquitär exprimiert sind, zeigen die Gene für die Hs6Ost und die Hs3Ost-A spezifische Expressionsmuster. Das Gen für die Hs6Ost ist, entsprechend der Funktion im FGF-Signalweg, vornehmlich in den Tracheen bzw. trachealen Vorläuferzellen exprimiert (Kamimura et al., 2001). Das Gen für die Hs3Ost zeigt eine frühe maternale Expression und dann eine Akkumulation der zygotisch exprimierten Transkripte im Stadium 11 im Mesoderm und ab Stadium 13 im ZNS (Abb. 17A).



**Abb.17.: RNA *in situ*-Hybridisation mit Sonden gegen CG33147**

A) und B) Expressionsmuster und genomische Organisation von CG33147.

A) Das Gen CG33147 kodiert für das Enzym Hs3Ost-A und ist maternal exprimiert (1). Im Stadium 10 kann eine stärkere Färbung im Mesoderm beobachtet werden (2) und im Stadium 13 ist das Gen im ZNS und im Mitteldarm exprimiert (3). Ab dem Stadium 14 kann eine verstärkte Färbung im ZNS beobachtet werden laterale (4) und ventrale (5) Ansicht.

B) Die genomische Organisation von CG33147 zeigt die Insertion des P-Elements HDEP37257. Es werden keine Exon/Intron-Strukturen gezeigt.

Das Gen für die Hs3Ost-A ist in allen Geweben exprimiert, die Slit-abhängige Migrationsprozesse durchlaufen. Um zu prüfen, ob dieses Enzym eine Rolle im Slit/Robo-Signalweg spielen könnte, wurden Fliegen mit einer P-Element Insertion im ersten Exon des Hs3Ost-A kodierenden Gens (Abb. 17B) mit defizienten Fliegen gekreuzt (Material & Methoden Kap. 4.3) und geprüft, ob die Nachkommen während der Embryonalentwicklung *sdc*-mutanten-ähnliche Defekte im Nervensystem aufwiesen. Die Nachkommen aus dieser Kreuzung zeigten jedoch keine Defekte im Nervensystem (Tab. 6).

**Tab. 6: *hs3Ost*-Mutanten**

Genotyp <sup>b</sup>	Überquerungen der ML <sup>c</sup> von inneren 1D4- gefärbten Axonen (%) <sup>a</sup>	Anzahl der untersuchten Segmente
HDEP37257/Df(2R)RM2-1	0	407 <sup>d</sup>
HDEP37257/Df(2R)PC4	0	473 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Embryonen Stadium 16-17, Axonbündel mit gleichem oder größerem Durchmesser als innere 1D4-gefärbte Axone  
<sup>b</sup> Allele in Material und Methoden  
<sup>c</sup> Mittellinie  
<sup>d</sup> alle Nachkommen der Kreuzung

### 3 Diskussion:

HSPGs kommen auf der Oberfläche und in der extrazellulären Matrix fast aller tierischen Zellen vor und bestehen aus einem Protein-Grundgerüst, an welches mehrere HSGAG-Ketten kovalent gebunden sind (Perrimon and Bernfield, 2000). In den letzten Jahren wurde durch die Identifikation und Charakterisierung von Mutanten in Genen von HSPG-Proteingerüsten und Enzymen, die an der Biosynthese von HSGAG beteiligt sind, zunehmend deutlicher, dass HSPGs eine wichtige Rolle in entwicklungsbiologischen Prozessen und spezifischen Signaltransduktionswegen einnehmen (Bellaiche et al., 1998; Binari et al., 1997; Häcker et al., 1997; Haerry et al., 1997; Lin et al., 1999; Lin and Perrimon, 1999). Bei *Drosophila* konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Vorhandensein extrazellulärer HSGAG-Zuckerketten für die Funktion diverser sezernierter Signalfaktoren wie Hh, Wg, FGF und Dpp wichtig ist (Belenkaya et al., 2004; Bornemann et al., 2004; Desbordes and Sanson, 2003; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Kirkpatrick et al., 2004; Kreuger et al., 2004; Lin et al., 1999; Takei et al., 2004; The et al., 1999).

Das *Drosophila-sdc*, welches für ein transmembranes HSPG-Proteingerüst kodiert, wurde 1994 als erstes HSPG bei Invertebraten identifiziert (Spring et al., 1994). Die Überexpression von *sdc* mit Hilfe eines EP-Elements an den epidermalen Segmentgrenzen bewirkt starke Phänotypen in den Muskeln (Molitor, 2002). *sdc* wird normalerweise in für die Muskelentwicklung relevanten Geweben bzw. Zellverbänden, nämlich dem Mesoderm und an den Segmentgrenzen des Embryos exprimiert (Molitor, 2002). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Sdc eine Funktion in der Regulation der Migration von Muskelvorläuferzellen, Axonen des ZNS und der VGZ des Tracheensystems hat. Auf genetischem Weg konnte Sdc als eine Komponente des Slit/Robo-Signalwegs identifiziert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Sdc auf den Slit-Rezipientenzellen gebraucht wird sowie dass die konservierte cytoplasmatische Region von Sdc für seine Funktion im Slit/Robo-Signalweg nicht essentiell ist.

#### 3.1 Die erzeugten *sdc*-Allele stellen starke hypomorphe oder amorphe Allele dar

*sdc*-mutante Embryonen weisen Defekte in den Muskeln, im Nerven- und im Tracheensystem auf. Die untersuchten *sdc*-Allele haben jedoch zwei Nachteile: zum einen kann durch RNA *in*

*situ*-Hybridisierungen mit einer Sonde gegen *sdc* noch eine verbleibende Färbung im Nervensystem detektiert werden und zum anderen betreffen die erzeugten Deletionen auch ein benachbartes Gen, *sara* (smad anchor for receptor activation) (Bennett and Alphey, 2002) und stellen somit Doppelmutanten dar.

In *sdc*-mutanten Embryonen kann in einer RNA *in situ*-Hybridisierung mit einer Sonde gegen *sdc* ab dem Stadium 13 eine Färbung in einigen Zellen des ZNS beobachtet werden. Die erzeugten Deletionen betreffen den Transkriptionsstartpunkt aller drei annotierten Transkripte und im Falle von *sdc*<sup>23</sup> zusätzlich den Translationsstart sowie das Signalpeptid. Deshalb müsste man annehmen dass, falls die noch verbleibende Färbung nicht unspezifischer Natur ist, *sdc* einen alternativen, bisher durch keine cDNA oder "expressed sequence tag" (EST) bestätigten Transkriptionsstartpunkt besitzt, von dem dieses Transkript produziert wird. Ferner müsste dieses alternative Transkript einen alternativen Translationsstartpunkt aufweisen sowie für ein Signalpeptid kodieren. Hinweise auf einen solchen alternativen Transkriptionsstartpunkt lieferte eine computergestützte Suche nach bisher unentdeckten Transkriptionsstartpunkten und Exonen in dem 68kbp großen zweiten Intron (Chung H. R., persönliche Mitteilung). Die Translation dieses putativen Transkripts würde zu einem funktionsfähigen Sdc mit einem Signalpeptid führen.

In *sdc*-mutanten Embryonen konnte in allerdings Antikörperfärbungen mit einem gegen ein carboxyterminales Epitop von Sdc generierten Antikörper, welches auch in der alternativen Sdc-Variante vorhanden sein müsste, jedoch kein Sdc-Protein nachgewiesen werden. So scheint die detektierte Färbung entweder unspezifischer Natur zu sein, oder das alternative Transkript wird im Embryo nicht translatiert bzw. kodiert für eine Sdc-Proteinvariante, die nicht von dem Sdc-Antikörper detektiert werden kann. Demzufolge sind die untersuchten Allele entweder starke hypomorphe oder amorphe Allele von *sdc*.

Weitergehende Versuche, wie der Versuch der Identifikation des alternativen Transkripts aus einer cDNA-Bibliothek und eine RNA *in situ*-Hybridisierung gegen das alternative Transkript werden darauf abzielen, die Natur dieses putativen alternativen Transkripts zu ergründen.

Beide *sdc*-Allele deletieren nicht nur den Transkriptionsstart und die ersten beiden Exone (bzw. das erste Exon und Teile des zweiten) von *sdc*, sondern stellen höchstwahrscheinlich auch Allele für das benachbarte Gen *sara* (Bennett and Alphey, 2002) dar, da diese Mutanten auch Teile der *sara*-Transkriptionseinheit bzw. der potenziellen *sara*-Promotorregion betreffen. *sdc*-Mutanten zeigen schwache Defekte im ZNS, dem Muskel- und dem Tracheensystem. Die vollständige Normalisierung dieser Phänotypen durch eine ubiquitäre

Expression eines *sdc*-Transgens zeigt, dass die hier beschriebenen Phänotypen auf die Mutation in der *sdc*- und nicht der *sara*-Transkriptionseinheit zurückzuführen sind.

### 3.2 Sdc ist eine Komponente des Slit/Robo-Signalwegs

*sdc*-mutante Embryonen zeigen Defekte im ZNS, im Muskel- und Tracheensystem. Der Vergleich dieser Phänotypen zeigt, dass in allen Geweben Migrationsdefekte vor allem in den ventralen Bereichen auftreten. So zeigen alle Gewebe zum Beispiel ein abnormes Wachstum über die ventrale Mittellinie hinweg. Diese Phänotypen deuteten darauf hin, dass Sdc an einem Signalweg beteiligt sein könnte, der gerichtete Wachstumsprozesse in verschiedenen Geweben der Ventralseite des Embryos reguliert.

Das von Glia-Zellen der Mittellinie sezernierte extrazelluläre Signal Slit ist ein Faktor, der über seine Rezeptoren aus der Robo-Familie auf Axone des ZNS, auf die Muskeln und auf die VGZ des Tracheensystems einwirkt, um deren gerichtetes Auswachsen an der Mittellinie zu regulieren (Englund et al., 2002; Kidd et al., 1999; Rajagopalan et al., 2000a; Rajagopalan et al., 2000b; Rothberg et al., 1990; Simpson et al., 2000a; Simpson et al., 2000b). Interessanterweise konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass Vertebraten-Slit eine Affinität zu an HSPG gebundene HSGAG-Ketten besitzt und dass in Zellkultur extrazelluläre HSGAG-Ketten notwendig für die volle Aktivität des humanen Slit2-Signals sind (Hu, 2001; Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001).

Diese Ergebnisse, die Kollokalisierung von Sdc mit dem Robo-Rezeptor sowie die Ähnlichkeit der Phänotypen von *sdc*-Mutanten mit *slit*-, *robo*- bzw. *robo2*-Mutanten geben Hinweise darauf, dass Sdc eine Rolle im Slit/Robo-Signalweg spielen könnte. Dies konnte auch genetisch gezeigt werden: transheterozygote *sdc*, *slit*-mutante Embryonen, in denen die Genaktivitäten von *sdc* und *slit* jeweils reduziert sind, zeigen vielfach stärkere Phänotypen als heterozygot *slit*-mutante Embryonen. Diese Verstärkung von spezifischen Phänotypen in transheterozygoten Embryonen ist ein guter Hinweis darauf, dass *sdc* und *slit* im gleichen genetischen Regelkreis wirken. Noch deutlicher zeigt sich der Effekt der genetischen Interaktion bei der Analyse der Axone im Nervensystem von *sdc*-Mutanten, in denen zusätzlich eine Kopie von *slit*, *robo* oder *robo2* mutiert ist. Eine zusätzliche Verringerung der Dosis an *slit*, *robo* oder *robo2*, die im Wildtyp keine oder nur schwache Phänotypen auslösen würde, führt im Nervensystem von homozygot *sdc*-mutanten Embryonen zu einer massiven Verstärkung des Phänotyps im ZNS. Hierbei zeigt sich, dass im ZNS von *sdc*-Mutanten, wie auch aus der Untersuchung von *slit*-, *robo*- und *robo2*-Einzelmutanten erwartet, eine

zusätzliche Verringerung der Dosis von *slit* die deutlichste Verstärkung der Phänotypen auslöst, gefolgt von *robo* und *robo2*. In diesen Mutanten konnte auch eine Erhöhung der Zahl der Muskeln beobachtet werden, welche die Mittellinie überqueren. Im Muskelsystem war jedoch die Verstärkung der Phänotypen nicht so deutlich wie im Nervensystem, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Muskeln weniger sensitiv auf eine Reduktion der Aktivität des Slit/Robo-Signalwegs reagieren.

Die Ergebnisse, bei denen das HSPG Sdc als eine Komponente des Slit/Robo-Signalwegs identifiziert werden konnte, sind konsistent sowohl mit Ergebnissen aus der Maus, bei denen eine genetische Interaktion bei der gerichteten Migration bestimmter Hirnnerven zwischen *slit* und der HSGAG-Polymerase *Ext1* (Inatani et al., 2003) als auch mit Ergebnissen bei *C.elegans*, bei denen die Abhängigkeit von Slit von spezifisch modifizierten HSGAG-Ketten gezeigt worden sind (Bulow and Hobert, 2004).

Ähnliche Ergebnisse zur Funktion von Sdc im Slit/Robo-Signalweg bei *Drosophila* zeigen Johnson et al. (Johnson et al., 2004). Die Penetranz der Phänotypen ist jedoch unterschiedlich. Dies lässt sich entweder auf einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund der *sdc*-Mutanten zurückführen oder aber auf eine unterschiedliche Art und Weise, mit der die Penetranz der Phänotypen bestimmt worden ist: in meiner Untersuchung wurden im ZNS nur Überquerungen der Mittellinie gewertet, bei denen die Axonbündel entweder ähnlich dick oder dicker als die inneren 1D4-gefärbten Axonbündel waren (siehe zum Beispiel Abb. 4 und Tab. 2).

### 3.3 Die Effizienz des Slit-Signals ist abhängig von Sdc

*sdc*-mutante Embryonen weisen, wenn auch in einer schwächeren Ausprägung, ähnliche Defekte im ZNS und in den Muskeln auf wie *slit*-mutante Embryonen. Während bei *slit*-Mutanten fast alle ventralen Muskeln die Mittellinie überqueren und alle Axone in der Mittellinie fusionieren, überqueren bei *sdc*-Mutanten nur einige der ventralen Muskeln die Mittellinie und nur in einzelnen Segmenten kann eine Mittellinienüberquerung von longitudinalen Axonen beobachtet werden. Ein Vergleich der Phänotypen von Mutanten einzelner *robo*-Gene, die für die Slit-Rezeptoren kodieren, mit denen von *sdc*-Mutanten zeigt eine deutlich größere Ähnlichkeit der Phänotypen. Dabei ähneln die Penetranz und die Phänotypen der Mutanten von *robo2* und *sdc* einander stark. Die schwächere Ausprägung der Phänotypen der Mutanten in den *robo*-Genen im Gegensatz zu der Mutation in *slit* lässt sich

darauf zurückführen, dass diese zumindest teilweise redundante Funktion aufweisen und in den jeweiligen Einzelmutanten die Transduktion des Slit-Signals zwar gestört, aber nicht vollständig ausgeschaltet ist (Rajagopalan et al., 2000a; Schimmelpfeng et al., 2001; Simpson et al., 2000b).

Worauf beruht aber der „schwache“ Phänotyp in *sdc*-mutanten Embryonen? Ein Vergleich mit dem Einfluss von HSGAG auf andere Signalwege zeigt, dass einige von diesen, wie dem Hh- oder dem FGF-Signalweg, stark von dem Vorhandensein von HSGAG abhängig sind, während die TGF $\beta$ - und Wg-Signalwege eine geringere Abhängigkeit von HSGAG aufweisen (Lin et al., 1999; Takei et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für den „schwachen“ *slit*-Mutanten-ähnlichen Phänotyp von *sdc*-Mutanten könnte also sein, dass die Effizienz des Slit/Robo-Signalwegs, ähnlich den TGF $\beta$ - und Wg-Signalwegen, nur zu einem gewissen Teil von HSGAG-Ketten abhängig ist. Sdc wäre daher also notwendig, aber nicht essentiell für den Slit/Robo-Signalweg. Eine Mutation in *sdc* führt dabei zu einer Reduktion der Aktivität, aber nicht zu einer vollständigen Störung des Signalwegs.

Falls man jedoch davon ausgeht, dass Sdc essentiell für den Slit/Robo-Signalweg ist, könnte eine Erklärung für den „schwachen“ *slit*-Phänotyp in *sdc*-Mutanten das bisher uncharakterisierte, alternative und in den verwendeten *sdc*-Allelen nicht betroffene *sdc*-Transkript darstellen. Trotz der Tatsache, dass in *sdc*-mutanten Embryonen kein Sdc-Protein mit einem Antikörper gegen die cytoplasmatische Region von Sdc nachgewiesen werden konnte, ist es möglich, dass dieses Transkript für die Bereitstellung eines „Hintergrundlevels“ an Sdc-Protein zuständig ist und der beobachtete Phänotyp im Nervensystem somit nicht den Ausfall-Phänotyp darstellt. Dieses Transkript könnte aber nur zu einer "Schwächung" des Phänotypen im Nervensystem führen, da es nur hier exprimiert ist. In *sdc*-mutanten Embryonen kann kein *sdc*-Transkript und kein Sdc-Protein in den Muskeln nachgewiesen werden. Die Muskeln können also als ein Testsystem dienen, um zu prüfen, ob ein vollständig *sdc*-negatives Gewebe in der Lage ist, auf das Slit-Signal zu reagieren. Falls Sdc essentiell für den Slit/Robo-Signalweg wäre und der "schwache" *slit*-Phänotyp im ZNS auf die Expression dieses putativen alternativen Transkripts zurückzuführen ist, würde man erwarten, dass außer einem "schwachen" *slit*-Phänotyp im Nervensystem dann in den Muskeln, ein "starker" *slit*-Phänotyp zu beobachten wäre. Da dies nicht der Fall war, kann man davon ausgehen, dass der schwache *slit*-Phänotyp von *sdc*-Mutanten zumindest in den Muskeln nicht auf das Vorhandensein eines potenziellen alternativen Transkripts zurückzuführen ist.

Eine weitere Erklärung für den schwachen *sdc*-Phänotyp könnte die maternale Expression der *sdc*-mRNA sein. *sdc*-Mutanten sind semilethal und *sdc*-mutante Weibchen sind fertil. Falls eine maternale *sdc*-Expression teilweise den zygotischen *sdc*-Phänotyp überdecken sollte, müßte man in jedem Gelege einige von homozygoten Müttern abstammende maternal und zygotisch mutante Embryonen finden, die einen starken *slit*-ähnlichen Phänotyp aufweisen. Dies ist aber nicht der Fall. In vorläufigen Versuchen mit Keimbahntransformierungsexperimenten konnten ebenfalls keine Embryonen mit starken *slit*-Mutanten-ähnlichen Phänotypen in den Muskeln beobachtet werden. Diese Experimente deuten darauf hin, dass die maternale Komponente von *sdc* ebenfalls nicht für den "schwachen" *sdc*-Phänotyp verantwortlich ist. Diese Beobachtungen sprechen für ein Modell, in dem Sdc für die Effizienz des Slit/Robo-Signalwegs zwar notwendig aber nicht essentiell ist.

Sdc ist nur eines von vier bei *Drosophila* identifizierten HSPG. *In vitro*-Bindungsstudien zeigten eine Interaktion von menschlichem Slit2 mit dem HSPG Glypikan (Liang et al., 1999; Ronca et al., 2001; Zhang et al., 2004). Menschliches wie auch *Drosophila*-Slit wird proteolytisch gespalten (Brose et al., 1999) und die Bindung an Glypikan erfolgt bei Vertebraten über die C-terminale Domäne von Slit. Diese Bindung ist von HSGAG-Ketten des Glypikans abhängig. Die N-terminale Region von Slit zeigt keine oder nur geringe Affinität zu Glypikan (Ronca et al., 2001). Sie ist aber der Teil, der mit dem Robo-Rezeptor interagiert und für die abstoßende Wirkung des Slit-Proteins im Nervensystem notwendig ist (Battye et al., 2001; Chen et al., 2001; Howitt et al., 2004; Nguyen Ba-Charvet et al., 2001). Da bei *Drosophila* jedoch noch nicht geklärt ist, an welcher Stelle das Slit-Protein proteolytisch gespalten wird und ob nur das N-terminale Fragment und/oder die ungeschittene Form von Slit von den Zellen an der Mittellinie zu den Rezipientenzellen diffundieren und abstoßend wirken, ergibt sich zusammen mit dem "schwachen" *sdc*-Phänotyp und der Affinität der C-terminalen Region von Slit zu HSGAG von Glypikan die Möglichkeit, dass andere HSPG eine Sdc-redundante Funktion im Slit/Robo-Signalweg einnehmen könnten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die *GAL4*-vermittelte Überexpression von *dlp* im ZNS von *sdc*-Mutanten den *sdc*-mutanten Nervensystem-Phänotyp partiell normalisieren konnte (siehe auch (Johnson et al., 2004)). Dieser Befund spricht ebenfalls für eine redundante Funktion verschiedener HSPG im Slit/Robo-Signalweg.

Die Analyse von zygotischen Mutanten der anderen *Drosophila*-HSPGs zeigte jedoch keine Slit/Robo-assoziierten Phänotypen im Nervensystem oder in den Muskeln. Dies bedeutet,



dass Sdc das HSPG sein könnte, welches hauptsächlich am Slit/Robo-Signalweg beteiligt ist, schließt jedoch eine additive Rolle anderer HSPG nicht vollständig aus.

In *sdc*-Mutanten sind keine Hh-assoziierten Phänotypen zu beobachten, ein Signalweg, der in *dlp*-Mutanten gestört ist (Desbordes and Sanson, 2003; Han et al., 2004b) und in Zellkultur zeigt der Hh-Signalweg Abhängigkeit von Dlp, nicht jedoch von Sdc (Lum et al., 2003). Dies, sowie die Beobachtung, dass Dally und Dlp unterschiedliche Funktionen im Hh-Signalweg während der Embryogenese und in der Flügelimaginalscheibe besitzen (Han et al., 2004b), deutet außerdem an, dass die einzelnen HSPGs spezifisch für bestimmte Signalwege sein könnten bzw. spezifische Funktionen in bestimmten Signalwegen haben könnten.

Um dies zu prüfen, ist es geplant, den *sdc*-Phänotyp mit dem Phänotyp *trol; sdc-/sdc; dally-/sdc; dlp*-doppel- und *sdc; dally, dlp*-tripelmutanter Embryonen sowie *sdc; sgl-/sdc; sfl*- und *ttv, sdc*-doppelmutanter Embryonen zu vergleichen. Bei diesen Embryonen sollte die Konzentration von extrazellulärem HSGAG weiter reduziert sein. Falls andere HSPG eine redundante Rolle zu Sdc im Slit/Robo-Signalweg hätten, würde man in diesen Doppel- und Tripelmantanten eine Verstärkung des Phänotyps erwarten. Sollte aber Sdc das spezifische HSPG für den Slit/Robo-Signalweg sein, dürfte es bei diesen Mutanten-Kombinationen keine Verstärkung des *sdc*-Phänotyps im Nervensystem und in den Muskeln geben.

Zusammengefasst zeigt sich, dass Sdc wahrscheinlich einen für die Effizienz des Slit-Signals notwendigen, aber nicht essentiellen Faktor im Slit/Robo-Signalweg darstellt. Der Slit/Robo-Signalweg scheint in seiner Funktion also nur zu einem gewissen Grad von Sdc abhängig zu sein. Die Beobachtung, dass in zygotischen Mutanten von Genen anderer HSPG keine Slit/Robo-assoziierten Phänotypen nachgewiesen werden konnten, deutet außerdem darauf hin, dass Sdc das spezifische HSPG für den Slit/Robo-Signalweg darstellt.

### 3.4 Robo- und Robo2-Rezeptorfunktionen sind Sdc-abhängig

Eine weitere mögliche Erklärung für den vergleichbar schwachen Phänotyp der *sdc*-Mutanten ist, dass Sdc spezifisch für einen Robo-Rezeptor sein könnte und die anderen Rezeptoren der Robo-Familie Sdc-unabhängig funktionieren. Um dies zu testen, wurden *sdc, robo*- und *sdc, robo2*-Doppelmantanten auf ihre Phänotypen hin untersucht. Mit *sdc, robo2*-Mutanten kann so untersucht werden, inwieweit der Robo-Rezeptor Sdc-unabhängig die Slit-Signale verarbeiten kann bzw. wie dies der Robo2-Rezeptor in *sdc, robo*-Mutanten kann. Der Rezeptor Robo3 wurde in diesen Versuchen vernachlässigt, da dieser für die Entscheidung der Axone, die Mittellinie zu überqueren, nur eine untergeordnete Rolle spielt (Rajagopalan et al., 2000a;

Simpson et al., 2000b). *sdc*, *robo2*-doppelmutante Embryonen zeigen einen *slit*- oder den *robo*, *robo2*-Phänotyp im ZNS und in den Muskeln. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Mutanten kein oder nur geringe Mengen des Slit-Signals über den verbleibenden Robo-Rezeptor transduziert werden. Die Funktion des Robo-Rezeptors ist demnach von Sdc abhängig. Anders sieht es in *sdc*, *robo*-Doppelmutanten aus. Hier kann nur eine schwache Verstärkung des *robo*-Phänotyps bei gleichzeitiger Abwesenheit von *sdc* beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Robo ein Sdc-abhängiger und Robo2 ein Sdc-unabhängiger Rezeptor bei der Vermittlung des abstoßend wirkenden Slit-Signals im Nervensystem und in den Muskeln sein könnte. Zwei Beobachtungen sprechen allerdings gegen dieses Modell. Zum einen weisen *sdc*-mutante Embryonen stärkere Phänotypen in den Muskeln als *robo*-Mutanten auf und zweitens zeigen *sdc*-Mutanten, in denen zusätzlich eine Kopie des Gens für den Robo2-Rezeptors mutiert ist, ebenfalls eine Verstärkung der Phänotypen. Es besteht also auch eine genetische Interaktion zwischen *sdc* und *robo2*.

Dieser Punkt konnte durch die Analyse der Phänotypen im Tracheensystem von *sdc*-mutanten Embryonen geklärt werden. Im Tracheensystem haben die beiden Rezeptoren getrennte Funktionen in Bezug auf die zelluläre Antwort der migrierenden Zellen auf das Slit-Signal (Englund et al., 2002). Bei *sdc*-mutanten Embryonen können Phänotypen beobachtet werden, die Ähnlichkeit sowohl mit *robo*-Mutanten als auch mit *robo2*-Mutanten aufweisen. Dies zeigt, dass beide Rezeptorfunktionen zumindest teilweise Sdc-abhängig sind. Vor dem Hintergrund der Muskel- und Nervensystem-Phänotypen der Doppelmutanten läßt sich vermuten, dass der Robo-Rezeptor wahrscheinlich empfindlicher auf reduzierte Sdc-abhängige Slit-Aktivität reagiert als der Robo2-Rezeptor.

### 3.5 Molekulare Rolle von Sdc bei der Vermittlung des Slit-Signals

Versuche mit mutanten Zellklonen in Genen, deren Produkte in der Biosynthese der HSGAG-Ketten beteiligt sind und an *dally*, *dlp*-doppelmutanten Zellklonen in der Flügelimaginalscheibe zeigten, dass extrazelluläre HSGAG-Ketten für die Stabilisierung, Regulation und/oder die Diffusion und Effizienz der Signalmoleküle Hh, Dpp und Wg notwendig sind (Baeg et al., 2004; Belenkaya et al., 2004; Bornemann et al., 2004; Desbordes and Sanson, 2003; Han et al., 2004a; Han et al., 2004b; Kirkpatrick et al., 2004; Kreuger et al., 2004; Takei et al., 2004; The et al., 1999). So kann beispielsweise das Hh-Signal, welches in der Flügelimaginalscheibe von den Zellen des posterioren Kompartments sezerniert wird, nicht über eine Reihe von Zellen hinwegdiffundieren, in denen die Biosynthese von HSGAG-

Ketten gestört ist (Bellaiche et al., 1998; Bornemann et al., 2004; Han et al., 2004a; Takei et al., 2004). Dies zeigt, dass HSPGs in der Flügelimaginalscheibe entweder an der Stabilisierung oder an der Diffusion von extrazellulären Signalen in der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Die an der Errichtung eines Hh- und Dpp-Konzentrationsgradienten in der Flügelimaginalscheibe hauptsächlich beteiligten HSPG sind die Glypikane Dally und Dlp (Belenkaya et al., 2004; Han et al., 2004a). Außerdem konnte für Dlp gezeigt werden, dass dieses in der Flügelimaginalscheibe an der Regulation lokaler Konzentration und der Wirksamkeit des Wg-Signals beteiligt ist (Baeg et al., 2004; Kirkpatrick et al., 2004; Kreuger et al., 2004).

Sdc ist ein Bestandteil des Slit/Robo-Signalwegs und falls Sdc eine ähnliche Funktion im Slit/Robo-Signalweg hätte wie die Glypikane für die Hh-, Dpp- und Wg-Signalwege in der Flügelimaginalscheibe, d.h. es an der Stabilisierung und/oder der Ermöglichung der Diffusion bzw. der Regulation lokaler Konzentrationen des Slit-Signals in der extrazellulären Matrix beteiligt ist, dann würde man erwarten, dass *sdc* und *slit* ähnliche oder zumindest teilweise überlappende Expressionsdomänen aufweisen. Interessanterweise ist *sdc* in allen Geweben exprimiert, die in *slit*-Mutanten betroffen sind, zeigt jedoch keine Koexpression mit *slit*. Vielmehr wird *sdc* oft in Domänen exprimiert, die genau an *slit*-exprimierende Domänen angrenzen. Diese Beobachtung gibt einen Hinweis darauf, dass Sdc im Slit/Robo-Signalweg in den Slit-rezipienten Zellen aktiv sein könnte. Dies zeigt auch die Doppel-Antikörperfärbung mit Antikörpern gegen Sdc und Robo. Sdc und Robo weisen in der Doppel-Antikörperfärbung eine Kolokalisierung an den longitudinalen Axonen der Nervenzellen wie auch an den Muskelanheftungsstellen auf.

Die Beobachtung, dass *sdc* in Zellen angrenzend zu *slit*-Expressionsdomänen exprimiert ist und Sdc mit dem Robo-Rezeptor auf den Slit-Rezipientenzellen kolokalisiert, läßt vermuten, dass Sdc, anders als die Glypikane in den Flügelimaginalscheiben, nicht an der Diffusion oder Stabilisierung von Signalen in der extrazellulären Matrix beteiligt ist, sondern eine mit den Robo-Rezeptoren gemeinsame Funktion an Slit-Rezipientenzellen ausübt. Dies konnte in gewebespezifischen Normalisierungsexperimenten nachgewiesen werden. Diese zeigen, dass die Expression von *sdc* an den *slit*-exprimierenden Mittellinienzellen in *sdc*-mutanten Embryonen nicht ausreicht, die Phänotypen im ZNS und in den Muskeln zu normalisieren. Die Funktion von Sdc liegt also nicht ausschließlich in der Produktion und/oder Exkretion des Slit-Signals. Gewebespezifische Normalisierungsexperimente zeigten außerdem, dass Sdc ausschließlich in den Zielzellen für den Slit/Robo-Signalweg notwendig ist: der Muskelphänotyp von *sdc*-mutanten Embryonen kann durch die Expression von *sdc* in den

Muskeln und der Phänotyp im ZNS durch die Expression von *sdc* im Nervensystem fast vollständig normalisiert werden. Besonders deutlich wird dies in gewebespezifischen Normalisierungsexperimenten in den Muskeln. In diesem Fall muß das Slit-Signal durch *sdc*-mutantes Nervengewebe diffundieren, um an die Robo-Rezeptoren der Muskelvorläuferzellen zu binden. Dies zeigt, dass Sdc ausschließlich an den Rezipientenzellen für den Slit/Robo-Signalweg notwendig ist und weder an der Produktion oder Sezernierung, noch an der Stabilisierung oder Diffusion des Slit-Signals in der extrazellulären Matrix von den Mittellinienzellen zu den Zielgeweben beteiligt ist. So lassen sich also zwei unterschiedliche Wirkungsmechanismen von Sdc und der Glypikane vermuten. Die Glypikane, die zur Diffusion oder Stabilisierung und der Ausbildung und Regulation eines Konzentrationsgradienten in einem Zell-Zell-vermittelten Mechanismus eines Signals über ein Gewebe und gleichzeitig zur Präsentation des Signals an seinen Rezeptor notwendig sind (Baeg et al., 2004; Belenkaya et al., 2004; Fujise et al., 2003; Han et al., 2004b; Kirkpatrick et al., 2004; Kreuger et al., 2004) und Sdc, welches nur an den Zielzellen zur Stabilisierung oder Präsentation des Signals an den Rezeptor notwendig sein könnte.

Eine mögliche Funktion von Sdc auf den Slit-Rezipientenzellen könnte in der Konzentration des Slit-Signals auf diese Gewebe liegen. Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass Slit auf *sdc*-exprimierenden Axonen konzentriert vorliegt und in *sdc*-mutanten Embryonen keine entsprechende Konzentration auf den Axonen feststellbar ist (Johnson et al., 2004). Falls dies der Fall wäre, würde man bei der Überexpression von *sdc* in der Mittellinie bzw. im gesamten Nervensystem von *sdc*-Mutanten eine Konzentration des Slit-Signals auf diese Zellen erwarten und durch die dadurch entstehende verringerte Aktivität des Slit-Signals in den Sdc-negativen Zielgeweben stärkere Phänotypen erwarten. Da weder die Expression von *sdc* in den *slit*-exprimierenden Zellen der Mittellinie noch im gesamten Nervensystem *sdc*-mutanter Embryonen in solch dominant-negativen Effekten im Nervensystem bzw. in den Muskeln resultiert, kann man vermuten, dass Sdc nicht an der Konzentration von Slit auf die Zelloberfläche bestimmter Gewebe beteiligt ist. Die beobachtete Konzentration des Slit-Signals auf die Axone der Nervenzellen durch Sdc (Johnson et al., 2004) könnte durch eine Stabilisierung von Slit durch eine Bindung an Sdc erklärt werden.

Eine zusätzliche interessante Beobachtung ist, dass in *sdc*-Mutanten die Expression von *sdc* im Nervensystem zu einer schwachen Normalisierung der Phänotypen in den Muskeln führt. Hier lassen sich Parallelen mit der Funktion der Glypikane in Signalwegen in der

Flügelimaginalscheibe ziehen: in größeren Klonen kann beobachtet werden, dass diese die Diffusion von Dpp verhindern, jedoch kann in der ersten Zellreihe des mutanten Klons, der auf der Seite von Dpp-sezernierenden Zellen liegt, die Aktivierung des Dpp-Signalwegs über die phosphorylierte Form von Mad (Mothers against Dpp) nachgewiesen werden (Belenkaya et al., 2004). Dies bedeutet, dass an HSPG-positiven Nachbarzellen gebundenes Dpp ausreicht, um die Rezeptoren der Nachbarzellen zu aktivieren und dass zur Aktivierung des Rezeptors kein Glypikan auf der eigenen Zelloberfläche gebunden sein muß. Auf diese Art und Weise könnte man auch die Beobachtung interpretieren, dass in *sdc*-Mutanten, in denen *sdc* in allen postmitotischen Zellen des Nervensystems exprimiert wird, ein etwas schwächerer Phänotyp in den Muskeln zu beobachten ist. Die ventralen Muskeln wachsen in engem Kontakt zu Zellen des ZNS aus und es wäre möglich, dass in diesen Embryonen, in denen Sdc in den Muskeln fehlt, Slit an Zellen des ZNS gebunden das Signal den migrierenden Muskelvorläuferzellen präsentiert und aus diesem Grunde ein etwas schwächerer Phänotyp entsteht. Dies würde bedeuten, dass die Funktion von Sdc hauptsächlich darin liegt, nicht-zellautonom an HSGAG gebundenes Slit dem Robo-Rezeptor zu präsentieren.

Zusammengefasst zeigt sich, dass während die Glypikane wahrscheinlich zur Diffusion oder Stabilisierung und der Ausbildung eines Konzentrationsgradienten in einem Zell-Zell-vermittelten Mechanismus eines Signals über ein Gewebe notwendig sind, Sdc auf den Slit-Rezipientenzellen notwendig ist und hier womöglich an der Stabilisierung des Slit-Signals oder eines Slit/Robo-Signalkomplexes bzw. an der Präsentation des Slit-Signals an den Robo-Rezeptor, jedoch nicht an der Konzentration des Slit-Signals auf bestimmte Gewebe, beteiligt sein könnte.

### **3.6 Die cytoplasmatische Region von Sdc ist nicht essentiell für die Funktion des Slit/Robo-Signalwegs**

Während bei *Drosophila* nur ein Sdc identifiziert werden konnte, sind in der Maus und dem Menschen jeweils vier Mitglieder dieser Proteinfamilie bekannt. Sequenzvergleiche zwischen diesen Proteinen zeigen eine hohe Konservierung in der cytoplasmatischen Region und in der Transmembrandomäne, während die extrazelluläre Region geringe oder keine Konservierung zwischen den Spezies aufweist (Spring et al., 1994).

Die hohe Konservierung dieser Bereiche bei den Mitgliedern dieser Proteinfamilie weist auf eine funktionelle Konservierung hin. Die Funktion der Syndecane bei Vertebraten ist

allerdings noch relativ unklar. *sdcl*-mutante Mäuse sind lebensfähig (Stepp et al., 2002) und zeigen eine geringere Anfälligkeit für Wnt-1-induzierte Tumoren (Alexander et al., 2000), was darauf hindeutet, dass Sdc1 im Wnt-1-Signalweg eine Rolle spielen könnte. Versuche mit Sdc2 der Maus zeigten, dass Sdc2 mit der EphrinB2-Rezeptor-Tyrosin-Kinase interagiert und an der Ausbildung von dendritischen Dornen ("dendritic spines") im Nervensystem beteiligt ist (Ethell et al., 2001; Ethell and Yamaguchi, 1999). Bei *Xenopus laevis* wurde nachgewiesen, dass Sdc2 an der Regulation der Ausbildung der linken bzw. rechten Körperachse beteiligt ist (Kramer and Yost, 2002). Sdc4 ist eine Komponente der fokalen Adhäsionen und könnte zusammen mit der PKC- $\alpha$  an der Formation dieser Strukturen beteiligt sein (Ishiguro et al., 2000; Keum et al., 2004; Lim et al., 2003; Oh et al., 1997a; Oh et al., 1997b; Woods and Couchman, 1994). In einigen Fällen konnte außerdem gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Region von Sdc wichtig für die Funktion des HSPG ist. Für Sdc2 und Sdc4 aus der Maus konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass die Überexpression der jeweiligen Gene zu einer verfrühten Ausbildung der dendritischen Dorne bzw. zu einer verstärkten Ausbildung von fokalen Adhäsionen führt (Ethell and Yamaguchi, 1999; Longley et al., 1999). Die Expression von C-terminal verkürzten Formen von Sdc führte jedoch im Falle von Sdc2 zu keiner verfrühten Ausbildung der dendritischen Dorne und im Falle von Sdc4 sogar zu einer Reduktion der fokalen Adhäsionen. Daraus wurde geschlossen, dass die cytoplasmatische Region wichtig für die Funktion der Proteine ist (Ethell and Yamaguchi, 1999; Longley et al., 1999). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung in der cytoplasmatischen Region von Sdc2 bei *Xenopus laevis* durch PKC $\alpha$  an der Regulation der Ausbildung der linken bzw. rechten Körperachse beteiligt ist (Kramer et al., 2002). Es wäre möglich, dass eine über die Transmembrandomäne erfolgende Di- oder Oligomerisation von Sdc (Asundi and Carey, 1995) über Modifizierungen wie Phosphorylierungen an spezifischen hochkonservierten Serin- oder Tyrosinresten in der cytoplasmatischen Region reguliert wird. Mit Hilfe eines "Hefe-Interaktionsscreens" konnten außerdem die CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) als möglicher Interaktionspartner für die C-terminale Region von Sdc identifiziert werden (Cohen et al., 1998; Hsueh and Sheng, 1999; Hsueh et al., 1998). Neben einer PDZ-Domäne enthält dieses Protein eine Calmodulin-Kinase sowie eine Calmodulin-Bindedomäne (Lopes et al., 2001). Die Beobachtung, dass Störungen im Calmodulin-Signalweg bei *Drosophila* Slit/Robo-ähnliche Phänotypen im Nervensystem auslösen (VanBerkum and Goodman, 1995) und genetische Interaktion mit dem Slit/Robo-Signalweg aufweisen (Fritz and VanBerkum, 2000), machten diesen putativen Sdc-Interaktionspartner zu einem guten Kandidaten für einen

Faktor, der über eine Bindung an Sdc eine Funktion im Slit/Robo-Signalweg haben könnte. In maternal und zygotischen Mutanten (Martin and Ollo, 1996) des *Drosophila*-Homologs dieses Proteins konnten jedoch keine Slit/Robo-assoziierten Phänotypen in diesen Embryonen nachgewiesen werden (eigene Beobachtung, Ergebnis nicht gezeigt). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zudem, dass bei *Drosophila* die gesamte cytoplasmatische Region von Sdc nicht essentiell für die Funktion von Sdc in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg ist. Eine im Nervensystem von *sdc*-Mutanten exprimierte C-terminal verkürzte Form von Sdc ist in der Lage, den *sdc*-Phänotyp im Nervensystem zu normalisieren. Dagegen ist eine Form von Sdc, in welcher die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Region deletiert worden ist, nicht in der Lage, den *sdc*-Phänotyp zu normalisieren, wenn diese im Nervensystem von *sdc*-mutanten Embryonen exprimiert wird.

Ebenso verhält es sich mit der Lokalisierung von Sdc auf die Axone der Nervenzellen. Während die ungekürzte Form sowie Sdc ohne seine cytoplasmatische Region bei einer Überexpression im Nervensystem mit Axonen der Nerven assoziiert sind, zeigt die Form von Sdc, in der die Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Region deletiert sind, Akkumulation um die Zellkörper der Nervenzellen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass die cytoplasmatische Region von Sdc nicht essentiell, die (Trans-)membranverankerung aber notwendig für die Funktion des Proteins im Slit/Robo-Signalweg ist. Es wäre jedoch möglich, dass die konservierte cytoplasmatische Region von Sdc zur Regelung des Aktivitätslevels des Sdc-Proteins gebraucht wird, diese Funktion in den vorgesehenen Experimenten aber durch eine starke Überexpression des Deletionskonstrukts überdeckt wird. Von *sdc*-Mutanten konnten bisher keine anderen Phänotypen als die Slit/Robo-assoziierten Phänotypen im ZNS, in den Muskeln und im Tracheensystem nachgewiesen werden. Es ist dennoch nicht ausgeschlossen, dass Sdc auch eine Funktion in anderen Prozessen ausübt und es bleibt zu klären, ob in diesen Prozessen die konservierte cytoplasmatische Region eine essentielle Rolle spielt.

Sdc kann proteolytisch gespalten und somit von der Zelloberfläche entfernt werden (Spring et al., 1994). Während vermutet wird, dass eine wahrscheinlich über die Hydrolase Notum erfolgte Spaltung des HSPG Dlp in der Flügelimaginalscheibe für eine negative Regulation des Wg-Aktivitätsgradienten in Bereichen hoher Wg-Konzentration notwendig sein könnte (Kirkpatrick et al., 2004; Kreuger et al., 2004), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression einer extrazellulären Form von Sdc, der die cytoplasmatische Region und die Transmembrandomäne fehlen und die ähnlich der gespaltenen Form von Sdc sein sollte, nicht ausreichend ist, den *sdc*-Phänotyp im Nervensystem zu normalisieren. Die Expression dieser

Form von *sdc* löst aber auch keine dominant-negativen Effekte aus. Dies zeigt, dass eine Spaltung von Sdc eine andere Funktion besitzen müßte, als das Modell für die Spaltung von Dlp in der Flügelimaginalscheibe impliziert. Nach diesem Modell dient die Spaltung der Entfernung des HSPG mitsamt des Wg-Signals von der Zelloberfläche und somit einer Minderung der Effizienz dieses Signalwegs (Kirkpatrick et al., 2004; Kreuger et al., 2004). Weitere Versuche müssen die genaue Lokalisierung des untersuchten *sdc*-Konstrukts zeigen und ob diese Form von Sdc mit HSGAG modifiziert ist. Versuche mit einer unspaltbaren Version von Sdc werden die funktionelle Bedeutung der Spaltung von Sdc in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg klären.

### 3.7 Spezifität von Sdc im Slit/Robo-Signalweg

Die Funktion von Sdc im Slit/Robo-Signalweg könnte einzig darin bestehen, HSGAG-Ketten auf der Zelloberfläche der Zielzelle zu präsentieren. Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Expression des Glypikans Dlp im Nervensystem der *sdc*-Mutanten zu einer partiellen Normalisierung des Phänotypen führt (siehe auch (Johnson et al., 2004)). Die nur partielle Normalisierung des *sdc*-Phänotyps als Folge der Expression des *dlp*-Transgens wäre dann darauf zurückzuführen, dass dieses keine genügend starke Expression aufweist und demzufolge die Konzentration der HSGAG-Ketten auf den Nervenzellen nicht genügend hoch ist, um die Folgen des *sdc*-Mangels auszugleichen.

Es wäre also zu klären, ob die partielle Normalisierung tatsächlich auf eine unzureichende Expression vom *dlp*-Transgen zurückzuführen ist. Hierzu könnte das *dlp*-Transgen im *sdc*-mutanten Nervensystem bei verschiedenen Temperaturen exprimiert werden. Da das verwendete *GAL4/UAS*-System temperatursensitiv ist, kann die Expressionsstärke des *dlp*-Transgens und somit auch die Menge der an das Glypikan Dlp gebundenen HSGAG-Ketten auf den Nervenzellen variiert werden. Damit kann getestet werden, ob eine Erhöhung oder eine Erniedrigung der Konzentration von Dlp bzw. von an Dlp gebundene HSGAG-Ketten im Nervensystem den Phänotyp beeinflusst und gegebenenfalls temperaturabhängig normalisiert. Eine andere Erklärung für die unvollständige Normalisierung ist, dass Slit zwar eine basale Affinität zu extrazellulären HSGAG-Ketten hat, aber ein wesentlicher Beitrag erst durch das HSPG Sdc bereitgestellt wird, das dann die vollständige Normalisierung ermöglicht. Was also unterscheidet Sdc von den Glypikanen? Zum einen die Membranverankerung des Proteins an der Zelloberfläche über eine Transmembrandomäne, zum anderen das Vorhandensein einer cytoplasmatischen Domäne. Letztere kann keine Spezifität bereitstellen, da Sdc ohne diese



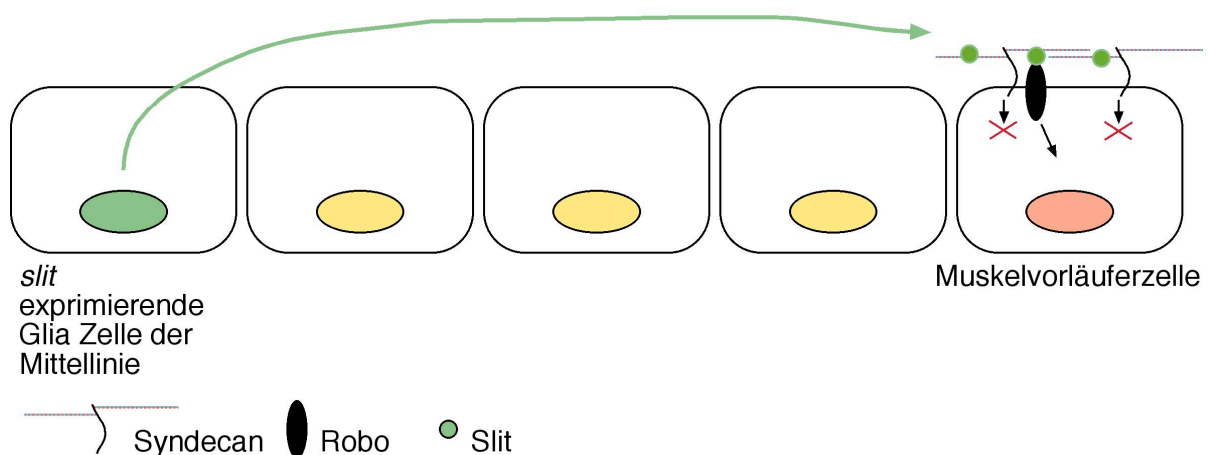
Domäne im Slit/Robo-Signalweg volle Sdc-Aktivität zeigt. Es wäre aber möglich, dass die transmembrane Domäne von Sdc eine spezifische Lokalisierung, eine Interaktion von Sdc mit dem Robo-Rezeptor oder eine Oligomerisation bewirkt und einer dieser Aspekte für die Spezifität von Sdc verantwortlich ist. Diese Hypothese könnte dadurch überprüft werden, dass Sdc-chimäre Proteine hergestellt werden, bei denen die Sdc-Transmembrandomäne durch eine andere, zum Beispiel die des Breathless-Rezeptors, ausgetauscht wird bzw. Transgene exprimiert werden, bei denen die extrazelluläre Domäne von Sdc an die C-terminale Region des Glypikans Dlp mit dem GPI-Anker fusioniert wird oder das Glypikan Dlp an die Transmembrandomäne und cytoplasmatische Region Domäne von Sdc fusioniert wird. Mit diesen kann dann auf die Fähigkeit hin getestet werden, den *sdc*-Phänotyp zu normalisieren.

Unmodifizierte HSGAG zeigen keine biologische Aktivität. Dieser Schluss ergibt sich aus den vergleichbaren Phänotypen der *sugarless* und *tout-velu*-Mutanten, bei denen die Synthese der HSGAG-Ketten unterbleibt (Toyoda et al., 2000a; Toyoda et al., 2000b), mit denen von *sfl*-Mutanten, bei denen keine Modifizierungen (Toyoda et al., 2000a) der HSGAG-Ketten stattfinden (siehe Einleitung) (Bellaiche et al., 1998; Binari et al., 1997; Häcker et al., 1997; Haerry et al., 1997; Lin and Perrimon, 1999; The et al., 1999). Untersuchungen an Vertebraten zeigten außerdem, dass Mutanten in Genen, die für HSGAG-modifizierende Enzyme kodieren, schwere Entwicklungsstörungen aufweisen (Bink et al., 2003; Bullock et al., 1998; Li et al., 2001; Li et al., 2003; Shworak et al., 2002). Auch Untersuchungen an *Drosophila* weisen darauf hin, dass bestimmte Signalwege abhängig von spezifisch modifizierten HSGAG-Ketten sind. So wurde nachgewiesen, dass die Hs6Ost essentiell für den FGF-Signalweg ist (Kamimura et al., 2001) und die Hs3Ost-B eine Rolle im Notch-Signalweg spielt (Kamimura et al., 2004). Interessanterweise konnte bei *C.elegans* beobachtet werden, dass die C5-Epimerase, Hs2Ost und Hs6Ost eine Rolle im Slit/Robo-Signalweg bei der Migration bestimmter Axone spielen (Bulow and Hobert, 2004).

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der partiellen Reversion durch Dlp wäre also, dass Slit zwar eine Grundaffinität zu HSGAG-Ketten besitzt, aber mit hoher Affinität nur an spezifisch modifizierte HSGAG-Ketten bindet. Es wäre also durchaus möglich, dass die HSGAG-Ketten von Sdc spezifisch modifiziert werden und dass diese Modifizierungen notwendig für die effiziente Bindung von Slit sind. Tatsächlich weisen HSGAG-Ketten von Glypikanen und Syndecanen aus derselben Zelllinie leichte Unterschiede in der HSGAG-Struktur auf (Tumova et al., 2000). Ferner erfolgt in Galaktosaminoglykanen, einer anderen Klasse von Proteoglykanen, die Modifizierung der HSGAG in HSPG-spezifischer Weise (Seidler et al., 2002). Ein möglicher Kandidat, der für den Slit/Robo-Signalweg spezifische

Modifizierungen an HSGAG-Ketten vornehmen könnte, ist das Gen für das HSGAG-modifizierende Enzym Hs3Ost-A. Dieses ist in allen Geweben exprimiert, die Slit-abhängige Migration aufweisen und akkumuliert in späteren Stadien im ZNS. RNAi Experimente zeigen, dass die Expression dieses Gens für die Lebensfähigkeit der Fliege essentiell ist (Kamimura et al., 2004). In ersten Versuchen mit P-Element-Insertionen in diesem Gen konnten jedoch keine Slit/Robo-ähnlichen Phänotypen nachgewiesen werden. Auch sind Fliegen, die das P-Element in trans über einer Defizienz tragen, lebensfähig. Dies zeigt, dass die P-Element-Insertion nur eine schwach hypomorphe oder keine Mutation darstellt. Sie kann allerdings zur Herstellung von Nullmutationen genutzt werden, um zu klären, ob Hs3Ost-A eine Rolle im Slit/Robo-Signalweg spielt.

Zusammengefasst ergibt sich, dass Sdc eine Komponente des Slit/Robo-Signalwegs ist und Sdc eine Funktion an den Slit-Rezipientenzellen ausübt. Die Funktion von Sdc besteht wahrscheinlich darin, das Slit-Signal auf den Slit-Rezipientenzellen zu stabilisieren, dem Robo-Rezeptor zu präsentieren oder aber den Zusammenbau des Slit/Robo-Signalkomplexes zu ermöglichen oder diesen zu stabilisieren, wobei die konservierte cytoplasmatische Region von Sdc nicht, eine Membranverankerung jedoch essentiell für die Funktion von Sdc in Bezug auf den Slit/Robo-Signalweg ist (siehe Abb. 18).



**Abb. 18: Modell für die Funktion von Sdc am Beispiel der Muskeln**

Slit wird von den Glia-Zellen der Mittellinie sezerniert und diffundiert durch das ZNS. Beide Prozesse erfolgen Sdc-unabhängig. An den Muskelvorläuferzellen wird Sdc zur Stabilisierung von Slit oder zur Präsentation des Signals an den Robo-Rezeptor gebraucht. Alternativ könnte Sdc an der Stabilisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes beteiligt sein. Die intrazelluläre Domäne von Sdc ist nicht essentiell für die Funktion von Sdc im Slit/Robo-Signalweg.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Molekularbiologische Methoden**

Soweit nicht anders beschrieben, wurde nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) verfahren. Die verwendeten Puffer, Medien und Lösungen sind, falls nicht anders beschrieben, ebenfalls hier zu finden.

#### **4.1.1 Präparierung von Plasmid-DNA**

Zur Präparierung von Plasmid DNA wurden in der Regel Qiagen Mini- bzw Midi-Säulen verwendet und nach Angaben des Hersteller verfahren.

#### **4.1.2 Schnelle Präparierung kleiner Mengen genomischer DNA für die PCR**

Jeweils eine adulte Fliege wurde mit CO<sub>2</sub> betäubt, in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und in 50 µl Mörserpuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,2; 1 mM EDTA; 25 mM NaCl; 200 µg/ml Proteinase K) mit der Spitze eines Eppendorfpipette für 5- 10 Sekunden zerdrückt. Nach 20- 30 minütiger Inkubierung bei Raumtemperatur wurde die Proteinase K in 1-2 minütiger Inkubation bei 95°C inaktiviert und bei 15000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.

#### **4.1.3 Präparierung größerer Mengen genomischer DNA**

100 µl Larven oder 20- 30 mit CO<sub>2</sub> betäubte adulte Fliegen wurden in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen in 180 µl PBS mit einem Mörser zerdrückt und die genomische DNA unter Verwendung von Qiagen-DNeasy-Säulen nach Vorschrift des DNeasy Tissue Protokoll von Qiagen (Qiagen GmbH) isoliert.

#### 4.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren (Qiagen GmbH).

#### 4.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki et al., 1988) wurde zur Analyse der durch die ungenaue Exzision des P-Elements erzeugten Fliegenlinien sowie für Klonierungen verwendet.

##### 4.1.5.1 PCR-Analyse der durch ungenaue Exzision des P-Elements EP G4752 erzeugten Fliegenlinien

Von einzelnen Fliegen wurde genomische DNA präpariert (siehe 4.1.2) und zur PCR-Analyse verwendet.

Die Primer wurden von der Firma MWG- Biotech AG synthetisiert.

Das verwendete Primerpaar zur Analyse der ungenauen Excisionen war:

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
sdcJOPr6	5'GACGCCGGTGTTGGTGTACTC 3'
sdcJOPr5	5'CAGCAGCCGCCTCGTCCTCTAT 3'
<u>Sequenzierprimer</u>	
T7-TOPO	5' GTAATACGACTCACTATAGGGG 3'
Sp6-TOPO	5' CCAAGCTATTTAGGTGACACTATAG 3'

Die PCR wurde mit den Komponenten des TaKaRaLA Taq<sup>TM</sup> Systems (TAKARA BIO INC., Japan) nach den Vorschriften des Herstellers auf der PCR-Maschine Gene Amp<sup>c</sup> PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Die PCR wurde in einem Volumen von 25  $\mu$ l durchgeführt mit jeweils 1  $\mu$ l der präparierten genomischen DNA als „Template“ und einer Primerkonzentration von jeweils 0,5  $\mu$ M.

<u>PCR-Programm:</u>	1x	94°C	1 Min.
	30x	98°C	10 Sek.
		58°C	30 Sek.
		68°C	10 Min.
	1x	72°C	10 Min.
		4°C	

Nach der PCR wurde der Ansatz vollständig auf ein Agarosegel geladen und die entsprechende Bande mit dem QIAquick PCR purification Kit (Qiagen GmbH) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Fragment wurde dann in den pCR<sup>RII</sup>-TOPO-Vektor (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers subkloniert und in One-shot<sup>®</sup> TOP10F'chemisch kompetente Zellen (Invitrogen) transformiert. Das Plasmid wurde durch eine Plasmid-Mini-Präparierung isoliert und mit den Vektor-eigenen Sequenzierprimern sequenziert.

#### 4.1.5.2 PCR Analyse zur Überprüfung des Insertionsortes des P-Elements HD-EP37257

Von einzelnen Fliegen wurde genomische DNA präpariert und zur PCR-Analyse verwendet. Die Primer wurden von der Firma MWG- Biotech AG synthetisiert.

Die verwendete Primerpaare zur Überprüfung des Insertionsortes des P-Elements HD-EP37257 waren:

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
<u>5'zum Insertionsort</u>	
checkHDEP37257-5'	5'GAGTTGGACCACCTCGCTCC 3'
P-Primer	5'CGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATG 3'
<u>3'zum Insertionsort</u>	
checkHDEP37257-3'	5'GTTAGGCCTTCTGTATGCAC 3'
P-Primer	5'CGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATG 3'

Die PCR wurde mit den Komponenten des HotStarTaq Systems nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen GmbH) durchgeführt. Die PCR wurde in einem Volumen von 25  $\mu$ l durchgeführt mit jeweils 1  $\mu$ l der präparierten genomischen DNA als „Template“ und einer Primerkonzentration von jeweils 0,5  $\mu$ M.

<u>PCR-Programm:</u>	1x	95°C	15 Min.
	30x	94°C	30 Sek.
		56°C	30 Sek.
		72°C	1 Min.
	1x	72°C	10 Min.
		4°C	

Nach der PCR wurde der Ansatz vollständig auf ein Agarosegel geladen und analysiert.

#### 4.1.5.3 PCR-Vermittelte Klonierung von *sdc*-Konstrukten

Zur PCR vermittelten Klonierung von *sdc*-Konstrukten wurden folgende Primer (MWG-Biotech AG) verwendet:

Name	Sequenz
<u><i>sdc</i>-RA-EGFP</u>	
Sall-fwd	5'GTCGACGGGGAAAATGAAGCCAAAGCA 3'
KpnI-rev	5'GGTACCGCGTAGAACTCGCGGTTATTCGC 3'
<u><i>sdc</i>/C</u>	
XhoI:fwd-main	5'CTCGAGATGAAGCCAAAGCAGAAGATTTC 3'
nu:rev-cyt	5'GGTACCAAGTACACGATGAACATGACCACG 3'
<u><i>sdc</i>/TC</u>	
XhoI:fwd-main	5'CTCGAGATGAAGCCAAAGCAGAAGATTTC 3'
nu:rev-ext	5'GGTACCAATCCGGGCTGCGAGAAGAAGC 3'
<u>Sequenzierprimer</u>	
T7-TOPO	5' GTAATACGACTCACTATAGGGG 3'
Sp6-TOPO	5' CCAAGCTATTTAGGTGACACTATAG 3'

Zur PCR wurde die Taq<sup>R</sup> Plus Precision Polymerase (Stratagene) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die PCR wurde in einem Volumen von 50  $\mu$ l durchgeführt mit jeweils 100 ng des EST ("Expressed sequence tag) LD08230 Plasmid-DNA als „Template“ und einer Primerkonzentration von jeweils 0,5  $\mu$ M.

<u>PCR-Programm:</u>	1x	94°C	5 Min.
	30x	94°C	30 Sek.
		59°C	30 Sek.
		72°C	90 Sek.
	1x	72°C	10 Min.
		4°C	

Nach der PCR wurde der Ansatz vollständig auf ein Agarosegel geladen und die entsprechende Bande mit dem QIAquick PCR purification Kit (Qiagen GmbH) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Fragment wurde dann in den pCR<sup>RII</sup>-TOPO-Vektor (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers subkloniert und in One-shot<sup>R</sup> TOP10F'chemisch kompetente Zellen (Invitrogen) transformiert. Das Plasmid wurde durch eine Plasmid-Mini-Präparierung isoliert das inserierte DNA-Fragment mit Hilfe der flankierenden Sequenzierprimer sequenziert.

#### 4.1.6 DNA-Sequenzierung

DNA wurde von Gordon Dowe auf einer ABI Prism<sup>TM</sup> 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) Sequenziermaschine sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Sequencher (Gene Codes Corporation) analysiert.

#### 4.1.7 Herstellung rekombinanter Plasmide für Keimbahntransformationen

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide für Keimbahntransformationen wurden folgende Vektoren verwendet:

<u>Vektor</u>	<u>Referenz</u>
<i>UAST<sub>EGFP</sub></i> -pCaSpeR3	B. Linder-Stuart (MPIIDpc)
<i>UAST</i> -pCaSpeR3	Brand & Perrimon, 1993
pBluescript II SK	Stratagene

Durch Schnitte mit geeigneten Restriktionsendonukleasen wurden Vektoren und Insertionsfragmente zur Herstellung rekombinanter Plasmide generiert, über ein Agarose-Gel aufgereinigt und mit dem QIAquick PCR purification Kit (Qiagen GmbH) nach Herstellerangaben isoliert. Die jeweiligen Fragmente und Vektoren wurden einer Ligationsreaktion (T4 DNA Ligase, Fermentas) unterworfen, in *Escherichia coli* Zellen des



Stammes DH5 $\alpha$  Zellen transformiert, auf selektive LB-Agarplatten ausplattiert und aus positiven Klonen das rekombinante Plasmid präpariert.

#### 4.1.7.1 Rekombinante Plasmide

<u>Konstruktbezeichnung</u>	<u>Klonierung</u>
<i>UAS-sdc-RA</i>	LD08230 wurde mit NotI/KpnI geschnitten und in den <i>UAS</i> -pCaSpeR3 (NotI/KpnI) kloniert
<i>UAS-sdc</i> $\square$ <i>C</i>	Das 1107 bp große PCR-Fragment <i>sdc</i> DC aus dem pCR <sup>II</sup> -TOPO Vektor (XhoI/KpnI), (siehe 4.1.5.3) wurde in den <i>UAS</i> <sub>EGFP</sub> -pCaSpeR3 (XhoI/KpnI) kloniert.
<i>UAS-sdc</i> $\square$ <i>TC</i>	Das 1032 bp große PCR-Fragment <i>sdc</i> DTC aus dem pCR <sup>II</sup> -TOPO Vektor (XhoI/KpnI), (siehe 4.1.5.3) wurde in den <i>UAS</i> <sub>EGFP</sub> -pCaSpeR3 (XhoI/KpnI) kloniert.
<i>UAS-sdc-RA-EGFP</i>	Das 1216 bp große PCR-Fragment <i>sdc-RA</i> aus dem pCR <sup>II</sup> -TOPO Vektor (Sall/KpnI), (siehe 4.1.5.3) wurde in den <i>UAS</i> <sub>EGFP</sub> -pCaSpeR3 (XhoI/KpnI) kloniert.

#### 4.1.8 Herstellung von „antisense“-RNA-Sonden

Zur Herstellung von Digoxigenin oder Fluorescein markierten "antisense"-RNA-Sonden wurde das RNA-Labeling and Detection Kit (Roche) verwendet und nach dem Protokoll der Hersteller vorgegangen. Die RNA-Sonde wurde mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für eine *in situ*-Hybridisierung wurden jeweils 2  $\mu$ l der RNA-Sonden eingesetzt.

RNA-Sonden:

<u>Gen</u>	<u>EST</u>	<u>Restriktionsverdau</u>	<u>Polymerase</u>
<i>sdc</i>	LD08230	EcoRV	T7
<i>slit</i>	LD39407	-	Sp6
<i>CG3194</i> (C5-epimerase)	SD14112	BstXI	Sp6
<i>CG10234</i> (Hs2Ost)	GH20044	BamHI	Sp6
<i>CG33147</i> (Hs3Ost-A)	GH20068	BamHI	Sp6
<i>CG4451</i> (Hs6Ost)	LD39166	BstXI	Sp6

## 4.2 Embryologie und Histologie

### 4.2.1 Fixieren von Embryonen für Antikörperfärbungen und RNA *in situ*-Hybridisierungen

Embryonen des gewünschten Alters, die auf einer Apfelsaftagarplatte abgelegt worden sind, wurden von dieser in einen Sieb gespült, mit Wasser gewaschen und anschließend für 3 Minuten in einer Hypochloridlösung (50% Klorix) dechorioniert. Danach wurden die Embryonen wiederum mit Wasser gewaschen und für 20 Minuten in einer Mischung aus Heptan und einer Fixierlösung (100 mM Hepes pH 6,9; 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM EGTA; 1% Formaldehyd) unter Schütteln inkubiert. Nach Entfernung der wässrigen Phase wurde 7,5 ml Methanol hinzugegeben und die Embryonen geschüttelt, um sie zu devitellinisieren. Die devitellinisierten Embryonen sinken zu Boden. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Embryonen drei mal mit Methanol gewaschen und bei -20°C aufbewahrt.

### 4.2.2 Antikörperfärbungen von Embryonen

Fixierte Embryonen wurden durch 3 x 5 minütiges Waschen mit PBT rehydriert und anschließend mit präabsorbierten Primärantikörper(n) über Nacht inkubiert.

<u>Antikörper</u>	<u>Antigen</u>	<u>Wirtstier</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Quelle</u>
Sdc31605	Sdc Cterm	Kaninchen	1:10 (Flouresz.) 1:200	s.u.
13C9	Robo	Maus	1:10	DSHB
C555.6	Slit	Maus	1:5	DSHB
Mhc	Mhc	Kaninchen	1:2000	D. Kiehart
1D4	FasII	Maus	1:15	DSHB
2A12	Lumen des Tracheensystems	Maus, IgM	1:5	DSHB

Am nächsten Morgen wurden die Embryonen 4 x 5 Minuten mit PBT und 2 x 20 Minuten mit PBT + 2% Ziegenserum gewaschen. Anschließend wurde der oder die sekundären Antikörper hinzugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

<u>sekundärer Antikörper</u>	<u>Wirtstier</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Quelle</u>
anti-Maus-biotinyliert	Pferd	1:400	Vector-Laboratories
anti-Kaninchen-biotinyliert	Pferd	1:400	Vector-Laboratories
anti-Maus-Alexa-488	Ziege	1:500	Molecular Probes
anti-Kaninchen-Alexa-568	Ziege	1:500	Molecular Probes
anti-mouse-IgM-biotinyliert	Ziege	1:600	Jackson

Nach sechs 10 minütigen Waschschritten mit PBT wurden Embryonen aus fluoreszenten Antikörperfärbungen auf Objektträger in Vectashield (Vector Laboratories) überführt und mit einem Leica TCS SP2 Konfokalen Mikroskop analysiert.

Embryonen aus Färbungen mit biotinyliertem sekundären Antikörper wurden viermal 10 Minuten mit PBT gewaschen. Zur Detektion wurde das ABC vectastain Elite Kit (Vectorlabs) verwendet. Hierzu wurden 10  $\mu$ l Lösung A mit 10  $\mu$ l der Lösung B in 500  $\mu$ l PBT gemischt und für 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Embryonen mit dieser Lösung für eine Stunde inkubiert und dann drei mal zehn Minuten mit PBT gewaschen. Nach der Überführung der Embryonen in Färbeschälchen in 500  $\mu$ l PBT wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 10  $\mu$ l einer 0,5 mg/ml DAB (Diaminobenzidintetrachlorid) Lösung und 10  $\mu$ l einer mit Wasser 1:100 verdünnten 37% igen Wasserstoffperoxidlösung ausgelöst. Zum Stoppen der Reaktion wurde fünfmal mit PBT gewaschen und über eine ansteigende Alkoholreihe entwässert und in Kanada Balsam (Sigma) eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiophot Lichtmikroskop.

### 4.2.3 Herstellung eines Antikörpers gegen Sdc

Polyklonale anti-Sdc-Antikörper wurden gegen das Peptid NNSYAKNANNREFYA (korrespondierend zu den C-terminalen Aminosäureresten von Sdc) in Kaninchen generiert und vom Hersteller gegen das gekoppelte Peptid Affinitätsgereinigt (Eurogentec).

### 4.2.4 RNA *in situ*-Hybridisierung an Embryonen

Zur RNA *in situ*-Hybridisierung von Embryonen wurden fixierte Embryonen durch dreimaliges Waschen mit PBT rehydriert. Nachfolgend wurden die Embryonen für 2 Minuten mit Proteinase K (500  $\mu$ g/ml) behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBT wurden die Embryonen in eine 1:1 PBT/Fixierlösung (10% Paraformaldehyd in PBS; 50 mM EGTA) überführt und für 20 Minuten postfixiert und fünfmal fünf Minuten mit PBT gewaschen. Danach wurden die Embryonen schrittweise in Hybridisierungslösung (50% Formamid; 5x SSC; 5  $\mu$ g/ml Heparin; 5 mg/ml Torulahefe-RNA, 0,1% Tween20; pH 6,7) überführt und für eine Stunde bei 65°C prähybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde abgezogen und die Sonde, welche in 30  $\mu$ l der Hybridisierungslösung vorgeheizt wurde, über Nacht dazugegeben. Am nächsten Morgen wurden die Embryonen viermal 15 Minuten bei 65°C in Hybridisierungslösung gewaschen. Dann wurden die Embryonen viermal fünf Minuten, einmal 15 und einmal 20 Minuten in PBT gewaschen und mit einem am Morgen präabsorbierten anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase Konjugat (AP-anti-DIG; 1:2000; Roche) inkubiert und danach die Embryonen dreimal fünf Minuten, einmal 10 und einmal 15 Minuten mit PBT gewaschen. Die Embryonen wurden daraufhin in AP-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl) überführt und zweimal fünf Minuten gewaschen. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 4,5  $\mu$ l NBT und 3,5  $\mu$ l BCIP in 1 ml AP-Puffer ausgelöst und nach der Entwicklung der Färbung durch achtmaliges Waschen mit PBT gestoppt. Anschließend wurden die Embryonen über eine Verdünnungsreihe in Ethanol überführt und in Kanada-Balsam (Sigma) eingebettet.

#### 4.2.5 Doppel-floureszente RNA *in situ*-Hybridisierung

Das Protokoll für die doppel-floureszente RNA *in situ*-Hybridisierung folgt dem Protokoll der normalen RNA *in situ*-Hybridisierung bis zur Inkubierung mit der Sonde. Im Falle der doppel-floureszenten RNA *in situ*-Hybridisierung werden die Embryonen über Nacht mit zwei Sonden inkubiert: zum einen mit einer Digoxigenin markierten Sonde und zum anderen mit einer Flourescein-markierten Sonde. Die Waschschrte am nächsten Morgen gleichen ebenfalls denen der herkömmlichen RNA *in situ*-Hybridisierung. Als erster Antikörper wurde ein anti-DIG-POD (Peroxidase) (präabsorbiert 1:2000 in PBT) (Roche) hinzugegeben und eine Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrte von 30 Minuten, in dem das PBT acht mal gewechselt wurde, wurden die Embryonen 30 Minuten mit 4  $\mu$ l TSA-Biotin in 200  $\mu$ l Amplifizierlösung (Perkin Elmer) inkubiert. Danach wurde für 30 Minuten gewaschen, wobei acht mal das PBT ausgetauscht wurde. Dann folgte eine 15 minütige Inkubierung bei 70°C um die Peroxidase zu inaktivieren und ein Waschschrte mit PBT. Daraufhin wurden die Embryonen für eine Stunde mit einem Streptavidin-Cy2 (Perkin Elmer) und einem anti-Fluo-POD-Antikörper (Roche) im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde unter achtmaligem Austausch des PBTs für 30 Minuten gewaschen und nachfolgend für 30 Minuten mit 4  $\mu$ l TSA-Cy3 (Perkin Elmer) in 200  $\mu$ l Amplifizierlösung (Perkin Elmer) inkubiert. Nach einem 30 minütigen Waschschrte wurden die Embryonen in Vectashield (Vectorlab) eingebettet und mit einem Leica TCS SP2 Konfokalen Mikroskop analysiert.

#### 4.2.6 Keimbahntransformierung

DNA für Keimbahntransformierungen wurde wie folgt aufbereitet: zu 40  $\mu$ g/ 300  $\mu$ l des DNA-Konstruktes wurden 300  $\mu$ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, Ambion) gegeben und gevortext. Nach Zentrifugation bei 15000 rpm in Phaselock (Eppendorf) Eppendorfröhrchen wurde die obere Phase entnommen und durch Zugabe von 30  $\mu$ l 3M NaAc (pH 5,2) und 750  $\mu$ l Ethanol gefällt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 15000 rpm wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals für 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet in 20  $\mu$ l Wasser aufgenommen und für 5 Minuten bei 60°C inkubiert. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt und 12  $\mu$ g des DNA-Konstrukts mit 4  $\mu$ g des "Helfer"-Plasmids in 200  $\mu$ l Wasser vermischt. Nach Fällern mit 20  $\mu$ l 3M NaAc (pH 5,2) und 500  $\mu$ l Ethanol, 30 minütiger Zentrifugation bei 15000 rpm, wurde das Pellet

zweimal mit 70% igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 20  $\mu$ l Wasser aufgenommen und nach Konzentrationsbestimmung die Konzentration der Lösung auf 400 ng DNA/ $\mu$ l eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation bei 15000 rpm für 5 Minuten wurden 15  $\mu$ l in ein neues Röhrchen überführt. Die Injektionen der *P*-Element-Konstrukte wurden von Sonja Fellert bzw. Ursula Jahns-Meyer am MPI für biophysikalische Chemie (Göttingen) durchgeführt.

### 4.3 Genetik

Als Wildtypstamm wurde *Drosophila melanogaster Oregon R* verwendet.

Folgende Fliegenstämme fanden in dieser Arbeit Verwendung:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Referenz</u>
P{EP}21140	<i>P{EP}</i> -Element integration im 2. Intron von <i>sdc</i> w; <i>P{EP}21140/CyO</i>	DeveloGen AG
P{EP}G4752	<i>P{EP}</i> -Element integration im 1. Intron von <i>sdc</i> w; <i>P{EP}G4752/CyO</i>	U. Schäfer
"jump starter"	$y^1 w$ ; <i>CyO H</i> { $w^{mc} = [2-3]$ } <i>HoP2.1/ Bc<sup>1</sup> Egfr<sup>E1</sup></i>	Bloomington Stock center
<i>sdc</i> <sup>23</sup>	<i>P{EP}</i> -Element Exzisionsline mit einer 2220 bp großen Deletion im <i>sdc</i> Gen: w; <i>sdc</i> <sup>23</sup> / <i>CyO</i> , <i>P{ftz-lacZ}</i>	diese Arbeit
<i>sdc</i> <sup>97</sup>	<i>P{EP}</i> -Element Exzisionsline mit einer 1086 bp großen Deletion im <i>sdc</i> Gen: w; <i>sdc</i> <sup>97</sup> / <i>CyO</i> , <i>P{ftz-lacZ}</i>	diese Arbeit
<i>sdc</i> <sup>23</sup> , <i>da-GAL4</i>	w; <i>sdc</i> <sup>23</sup> / <i>CyO</i> , <i>P{ftz-lacZ}</i> ; <i>P{w=da-GAL4}/ P{w=da-GAL4}</i>	diese Arbeit
<i>sdc</i> <sup>23</sup> , <i>UAS-sdc-RA</i>	w; <i>sdc</i> <sup>23</sup> / <i>CyO</i> , <i>P{ftz-lacZ}</i> ; <i>P{w=UAS-sdc-RA}/ P{w=UAS-sdc-RA}</i>	diese Arbeit
<i>da-GAL4</i>	w; +/+; <i>P{w=da-GAL4}/ P{w=da-GAL4}</i>	A. Herzig, nicht publiziert
<i>en-GAL4</i>	w;; <i>P{w=en-GAL4}/ P{w=en-GAL4}</i>	Bloomington Stock center
<i>UAS-sdc-RA</i>	w; +/+; <i>P{w=UAS-sdc-RA}/ P{w=UAS-sdc-RA}</i>	diese Arbeit
double blue balancer	$y^1 w^*$ ; $wg^{Sp-1}/CyO$ <i>P{ftz-lacZ}</i> ; <i>Dr<sup>*</sup>/TM3</i> , <i>Sb P{ftz-lacZ}</i>	A. Michelson
<i>robo</i> <sup>Q1-15</sup>	w; <i>robo</i> <sup>Q1-15</sup> / <i>CyO</i> <i>P{ftz-lacZ}</i>	(Schimmelpfeng et al., 2001)
<i>robo</i> <sup>2<sup>leak</sup></sup>	w; <i>robo</i> <sup>2<sup>leak</sup></sup> / <i>CyO</i> <i>P{ftz-lacZ}</i>	(Schimmelpfeng et al., 2001)
<i>slit</i> <sup>2</sup>	w; <i>cn<sup>1</sup> slit<sup>2</sup> bw<sup>1</sup> sp<sup>1</sup></i> / <i>CyO</i> <i>P{ftz-lacZ}</i>	Bloomington Stock center
<i>sdc</i> <sup>23</sup> , <i>sim-GAL4</i>	w; <i>sdc</i> <sup>23</sup> / <i>CyO</i> <i>P{ftz-lacZ}</i> ; <i>P{w=sim-GAL4}/ P{w=sim-GAL4}</i>	diese Arbeit
<i>sdc</i> <sup>23</sup> , <i>elav-GAL4</i>	w; <i>sdc</i> <sup>23</sup> / <i>CyO</i> <i>P{ftz-lacZ}</i> ; <i>P{w=elav-GAL4}/ P{w=elav-GAL4}</i>	diese Arbeit

<i>sdc<sup>23</sup>, mef2-GAL4</i>	w; <i>sdc<sup>23</sup>/CyO P{ftz-lacZ}; P{w=mef2-GAL4}/ P{w=mef2-GAL4}</i>	diese Arbeit
<i>sim-GAL4</i>	w; +/+; <i>P{w=sim-GAL4}/ P{w=sim-GAL4}</i>	(Menne et al., 1997), erhalten von C.Klämbt
<i>elav-GAL4</i>	w; +/+; <i>P{w=elav-GAL4}/ P{w=elav-GAL4}</i>	(Lin and Goodman, 1994)
<i>24B-GAL4</i>	w; +/+; <i>P{w=24B-GAL4}/ P{w=24B-GAL4}</i>	(Brand and Perrimon, 1993)
<i>mef2-GAL4</i>	w; +/+; <i>P{w=mef2-GAL4}/ P{w=mef2-GAL4}</i>	M. Taylor, nicht publiziert
<i>sftl<sup>9B4</sup></i>	w; +/+; <i>sftl<sup>9B4</sup> P{w=FRT21}/TM6b Tb<sup>1</sup></i>	(Lin and Perrimon, 1999), erhalten von A. Voigt
<i>sgt<sup>A31</sup></i>	w; +/+; <i>mwh<sup>1</sup> sgt<sup>A31</sup> red<sup>1</sup> e<sup>1</sup>/TM6B Tb<sup>1</sup></i>	Bloomington Stock center
<i>ttv<sup>00681b</sup></i>	w; <i>cn<sup>1</sup> P{ry<sup>+7.2</sup>=PZ}Cyt-b<sup>500681a</sup> P{PZ}ttv<sup>00681b</sup>/CyO; ry<sup>506</sup></i>	Bloomington Stock center
<i>dally<sup>ΔP-527</sup></i>	w; +/+; <i>dally<sup>ΔP-527</sup>/ dally<sup>ΔP-527</sup></i>	(Nakato et al., 1995) erhalten von A. Voigt
<i>dally<sup>80</sup></i>	w; +/+; <i>dally<sup>80</sup>/ TM6b e act-EGFP</i>	(Han et al., 2004b)
<i>dly<sup>A187</sup></i>	w; +/+; <i>e dlp<sup>A187</sup>/ TM6b e act-EGFP</i>	(Han et al., 2004b)
<i>dally<sup>80</sup>, dly<sup>A187</sup></i>	w; +/+; <i>e dlp<sup>A187</sup> dally<sup>80</sup>/ TM6b e act-EGFP</i>	(Han et al., 2004b)
<i>trol<sup>null</sup></i>	<i>trol<sup>null</sup>/FM7c act-EGFP</i>	(Voigt et al., 2002)
<i>sdc<sup>23</sup>, UAS-sdcΔC</i>	w; <i>sdc<sup>23</sup>/CyO P{ftz-lacZ}; P{w=UAS-sdcΔCΔEGFP}/ P{w=UAS-sdcΔCΔEGFP}</i>	diese Arbeit
<i>sdc<sup>23</sup>, UAS-sdcΔTC</i>	w; <i>sdc<sup>23</sup>/CyO P{ftz-lacZ}; P{w=UAS-sdcΔTCΔEGFP}/ P{w=UAS-sdcΔTCΔEGFP}</i>	diese Arbeit
<i>UAS-sdc-EGFP</i>	w; +/+; <i>P{w=UAS-sdcΔEGFP}/ P{w=UAS-sdcΔEGFP}</i>	diese Arbeit
<i>UAS-dlp</i>	w; +/+; <i>P{w=UAS-dlp}/ P{w=UAS-dlp}</i>	X.Lin, unveröffentlicht
<i>sdc<sup>23</sup>, UAS-dlp</i>	w; <i>sdc<sup>23</sup>/CyO P{ftz-lacZ}; P{w=UAS-dlp}/ P{w=UAS-dlp}</i>	diese Arbeit
<i>sdc<sup>23</sup>, robo<sup>Q1-15</sup></i>	w; <i>sdc<sup>23</sup> robo<sup>Q1-15</sup>/CyO P{ftz-lacZ}</i>	diese Arbeit
<i>sdc<sup>23</sup>, robo2<sup>leak</sup></i>	w; <i>robo2<sup>leak</sup> sdc<sup>23</sup>/CyO P{ftz-lacZ}</i>	diese Arbeit
<i>sdc<sup>23</sup>, slit<sup>2</sup></i>	w; <i>slit<sup>2</sup> sdc<sup>23</sup>/CyO P{ftz-lacZ}</i>	diese Arbeit
HDEP37257	<i>P{EP}</i> -Element integration im 1. Exon von <i>CG33147</i> w; <i>P{HDEP}33147/ P{HDEP}33147</i>	DeveloGen AG
Df(2R)PC4	Defizienz 55A1-55F2	Bloomington Stock center
Df(2R)RM2-1	Defizienz 54F2-56A1	Bloomington Stock center

Die in der Beschreibung der einzelnen Stämme verwendeten Gen- und Allelsymbole sind in Lindsley und Zimm (1992) und in der Flybase ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)) beschrieben.

### 4.3.1 Erzeugung von Allelen über ungenaue Exzision eines P-Elements

Zur Erzeugung von genomischen Deletionen im *sdc*-Gen wurde das P-Element *P{EP}G4752* durch Einkreuzen eines „jump starter“-Chromosoms (Robertson et al., 1988) mobilisiert. Die „jump starter“-Linie wurde mit der *P{EP}*-Element-Insertionslinie gekreuzt und aus der F<sub>1</sub>-Generation rotäugige Fliegen mit dem *CyO* "Balancer" mit Fliegen der „Balancer“-Linie *yw; Tft/CyO* gekreuzt. Aus der F<sub>2</sub>-Generation wurden weißäugige Fliegen wiederum in Einzelkreuzungen mit *yw; Tft/CyO* Fliegen gekreuzt. Um die neuen Fliegenlinien stabil zu halten, wurden in der F<sub>3</sub>-Generation weißäugige Fliegen über dem *CyO* "Balancer" ohne den Marker *Tft* miteinander ausgekreuzt. Diese so etablierten Fliegenlinien wurden über die PCR-Analyse der durch die ungenaue Exzision des P-Elements EP G4752 erzeugten Fliegenlinien auf entstandene Deletionen analysiert (siehe oben).

### 4.3.2 Ektopische Expression von Transgenen mit dem *GAL4/UAS*-System

Für die ektopische Expression von Transgenen wurde das *GAL4/UAS*-System (Brand and Perrimon, 1993) verwendet. Die eine Komponente des Systems ist eine transgene Fliegenlinie, bei der das *GAL4*-Gen aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unter der Kontrolle eines regulatorischen Promotorelements exprimiert wird und somit die Produktion des GAL4-Proteins in verschiedenen embryonalen Regionen steuert (Treiberlinie). Die zweite Komponente des Systems ist ebenfalls ein transgener Fliegenstamm, bei dem das zu exprimierende Zielgen unter der Kontrolle von 5 hintereinandergeschalteten Gal4p-bindenden „upstream activating sequences“ (*UAS*) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* steht.

Werden beide Fliegenlinien zusammengekreuzt, bindet das GAL4 an die *UAS*-Sequenzen und aktiviert die Expression des Zielgens. Die Nachkommen aus diesen Kreuzungen wurden bei 25°C herangezogen. Die Expression von EGFP-Fusionskonstrukten wurde am Leica TCS SP2 Konfokalen Mikroskop analysiert.



## 5 Zusammenfassung

Slit ist ein extrazelluläres Signalmolekül, welches von Glia-Zellen der ventralen Mittellinie sezerniert als ein abstoßendes Signal wirkt, das Axone an einer Überquerung der Mittellinie hindert. Zusätzlich zu seiner Funktion im Nervensystem wirkt Slit als ein regulierender Faktor bei Migrationsprozessen von Muskelvorläuferzellen und ventralen Zweigen des Tracheensystems. Slit bindet an Rezeptoren der Robo-Familie.

In einer Durchmusterung einer EP-Element-Kollektion zur Identifikation von Faktoren, die an der Kontrolle des Richtungswachstums von Muskelvorläuferzellen beteiligt sind, konnte ein in der *sdc*-Transkriptionseinheit inseriertes EP-Element identifiziert werden. Die Überexpression an den Segmentgrenzen und in einem intrasegmentalen Streifen führt zu Störungen im Muskelmuster. Syndecan ist ein über eine Transmembrandomäne an der Zelloberfläche gebundenes Protein, in dessen extrazellulärem Bereich Heparansulfat-Glykosaminoglykan-Ketten kovalent gebunden sind. Heparansulfat-Proteoglykane spielen eine Rolle in der Regulation extrazellulärer Signalwege.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Sdc während gerichteter Migrationsprozesse in den Muskeln, im Nerven- und im Tracheensystem näher charakterisiert. *sdc*-mutante Embryonen zeigen ähnliche Phänotypen, wie Mutanten in Genen des Slit/Robo-Signalwegs und Sdc kolokalisiert mit dem Robo-Rezeptor auf den longitudinalen Axonen des ZNS und an den Apodemen. Genetische Interaktionsstudien konnten Sdc als Teil des Slit/Robo-Signalwegs identifizieren: *sdc*-Allele zeigen genetische Interaktionen mit *slit*- sowie mit *robo*- und *robo2*-Allelen. In gewebespezifischen Normalisierungsexperimenten konnte ferner gezeigt werden, dass Sdc ausschließlich an den Slit-Rezipientenzellen notwendig ist und dient dort womöglich als Korezeptor zu den Slit-Rezeptoren der Robo-Familie. Dies steht im Gegensatz zu der postulierten Funktion der Glypikane, einer anderen Klasse von HSPGs, von denen vermutet wird, dass sie für den Transport von Liganden notwendig sind. Eine eigenständige Rezeptorfunktion von Sdc mit einer Signalfunktion auf cytoplasmatische Faktoren über die konservierte cytoplasmatische Region konnte ausgeschlossen werden, da eine carboxyterminal deletierte Form von Sdc volle Sdc-Aktivität im Slit/Robo-Signalweg bereitstellt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, M.D., S.E. Celniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne, P.G. Amanatides, S.E. Scherer, P.W. Li, R.A. Hoskins, R.F. Galle, R.A. George, S.E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S.N. Henderson, G.G. Sutton, J.R. Wortman, M.D. Yandell, Q. Zhang, L.X. Chen, R.C. Brandon, Y.H. Rogers, R.G. Blazej, M. Champe, B.D. Pfeiffer, K.H. Wan, C. Doyle, E.G. Baxter, G. Helt, C.R. Nelson, G.L. Gabor, J.F. Abril, A. Agbayani, H.J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R.M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E.M. Beasley, K.Y. Beeson, P.V. Benos, B.P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M.R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K.C. Burtis, D.A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J.M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L.B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A.D. Mays, I. Dew, S.M. Dietz, K. Dodson, L.E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B.C. Dunkov, P. Dunn, K.J. Durbin, C.C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A.E. Gabrielian, N.S. Garg, W.M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J.H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N.L. Harris, D. Harvey, T.J. Heiman, J.R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K.A. Houston, T.J. Howland, M.H. Wei, C. Ibegwam, et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287:2185-95.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, und P. Walter. 2002. Molecular Biology of the Cell<sup>4</sup>. *Garland Publishing, New York*.
- Alexander, C.M., F. Reichsman, M.T. Hinkes, J. Lincecum, K.A. Becker, S. Cumberledge, und M. Bernfield. 2000. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet*. 25:329-32.
- Asundi, V.K., und D.J. Carey. 1995. Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region. *J Biol Chem*. 270:26404-10.
- Azpiazu, N., P.A. Lawrence, J.P. Vincent, und M. Frasch. 1996. Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev*. 10:3183-94.

- Baeg, G.H., E.M. Selva, R.M. Goodman, R. Dasgupta, und N. Perrimon. 2004. The Wingless morphogen gradient is established by the cooperative action of Frizzled and Heparan Sulfate Proteoglycan receptors. *Dev Biol.* 276:89-100.
- Baker, R., und G. Schubiger. 1996. Autonomous and nonautonomous Notch functions for embryonic muscle and epidermis development in *Drosophila*. *Development.* 122:617-26.
- Bate, M. 1990. The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development.* 110:791-804.
- Battye, R., A. Stevens, R.L. Perry, und J.R. Jacobs. 2001. Repellent signaling by Slit requires the leucine-rich repeats. *J Neurosci.* 21:4290-8.
- Baylies, M.K., und M. Bate. 1996. twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science.* 272:1481-4.
- Baylies, M.K., M. Bate, und M. Ruiz Gomez. 1998. Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell.* 93:921-7.
- Baylies, M.K., A. Martinez Arias, und M. Bate. 1995. wingless is required for the formation of a subset of muscle founder cells during *Drosophila* embryogenesis. *Development.* 121:3829-37.
- Becker, S., G. Pasca, D. Strumpf, L. Min, und T. Volk. 1997. Reciprocal signaling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles. *Development.* 124:2615-22.
- Beinert, N., M. Werner, G. Dowe, H.R. Chung, H. Jäckle, und U. Schäfer. 2004. Systematic gene targeting on the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma.*
- Belenkaya, T.Y., C. Han, D. Yan, R.J. Opoka, M. Khodoun, H. Liu, und X. Lin. 2004. *Drosophila* Dpp morphogen movement is independent of dynamin-mediated endocytosis but regulated by the glypican members of heparan sulfate proteoglycans. *Cell.* 119:231-44.
- Bellaiche, Y., I. The, und N. Perrimon. 1998. Tout-velu is a *Drosophila* homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature.* 394:85-8.
- Bennett, D., und L. Alphey. 2002. PP1 binds Sara and negatively regulates Dpp signaling in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 31:419-23.

- Binari, R.C., B.E. Staveley, W.A. Johnson, R. Godavarti, R. Sasisekharan, und A.S. Manoukian. 1997. Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling. *Development*. 124:2623-32.
- Bink, R.J., H. Habuchi, Z. Lele, E. Dolk, J. Joore, G.J. Rauch, R. Geisler, S.W. Wilson, J. den Hertog, K. Kimata, und D. Zivkovic. 2003. Heparan sulfate 6-o-sulfotransferase is essential for muscle development in zebrafish. *J Biol Chem*. 278:31118-27.
- Bornemann, D.J., J.E. Duncan, W. Staatz, S. Selleck, und R. Warrior. 2004. Abrogation of heparan sulfate synthesis in *Drosophila* disrupts the Wingless, Hedgehog and Decapentaplegic signaling pathways. *Development*. 131:1927-38.
- Bour, B.A., M. Chakravarti, J.M. West, und S.M. Abmayr. 2000. *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev*. 14:1498-511.
- Bourgouin, C., S.E. Lundgren, und J.B. Thomas. 1992. Apterous is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron*. 9:549-61.
- Brand, A.H., und N. Perrimon. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118:401-15.
- Brose, K., K.S. Bland, K.H. Wang, D. Arnott, W. Henzel, C.S. Goodman, M. Tessier-Lavigne, und T. Kidd. 1999. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*. 96:795-806.
- Brown, N.H. 1994. Null mutations in the alpha PS2 and beta PS integrin subunit genes have distinct phenotypes. *Development*. 120:1221-31.
- Buff, E., A. Carmena, S. Gisselbrecht, F. Jimenez, und A.M. Michelson. 1998. Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors. *Development*. 125:2075-86.
- Bullock, S.L., J.M. Fletcher, R.S. Beddington, und V.A. Wilson. 1998. Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev*. 12:1894-906.

- Bulow, H.E., und O. Hobert. 2004. Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. *Neuron*. 41:723-36.
- Callahan, C.A., J.L. Bonkovsky, A.L. Scully, und J.B. Thomas. 1996. derailed is required for muscle attachment site selection in *Drosophila*. *Development*. 122:2761-7.
- Carmena, A., M. Bate, und F. Jimenez. 1995. Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev*. 9:2373-83.
- Carmena, A., S. Gisselbrecht, J. Harrison, F. Jimenez, und A.M. Michelson. 1998a. Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev*. 12:3910-22.
- Carmena, A., B. Murugasu-Oei, D. Menon, F. Jimenez, und W. Chia. 1998b. Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev*. 12:304-15.
- Chen, J.H., L. Wen, S. Dupuis, J.Y. Wu, und Y. Rao. 2001. The N-terminal leucine-rich regions in Slit are sufficient to repel olfactory bulb axons and subventricular zone neurons. *J Neurosci*. 21:1548-56.
- Cohen, A.R., D.F. Woods, S.M. Marfatia, Z. Walther, A.H. Chishti, J.M. Anderson, und D.F. Wood. 1998. Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol*. 142:129-38.
- Cooley, L., R. Kelley, und A. Spradling. 1988. Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science*. 239:1121-8.
- Corbin, V., A.M. Michelson, S.M. Abmayr, V. Neel, E. Alcamo, T. Maniatis, und M.W. Young. 1991. A role for the *Drosophila* neurogenic genes in mesoderm differentiation. *Cell*. 67:311-23.
- Couchman, J.R. 2003. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:926-37.
- D'Alessio, M., und M. Frasch. 1996. msh may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech Dev*. 58:217-31.

- Desbordes, S.C., und B. Sanson. 2003. The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Development*. 130:6245-55.
- Dohrmann, C., N. Azpiazu, und M. Frasch. 1990. A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes Dev.* 4:2098-111.
- Dworak, H.A., und H. Sink. 2002. Myoblast fusion in *Drosophila*. *Bioessays*. 24:591-601.
- Englund, C., P. Steneberg, L. Falileeva, N. Xylourgidis, und C. Samakovlis. 2002. Attractive and repulsive functions of Slit are mediated by different receptors in the *Drosophila* trachea. *Development*. 129:4941-51.
- Esko, J.D., und S.B. Selleck. 2002. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem.* 71:435-71.
- Ethell, I.M., F. Irie, M.S. Kalo, J.R. Couchman, E.B. Pasquale, und Y. Yamaguchi. 2001. EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron*. 31:1001-13.
- Ethell, I.M., und Y. Yamaguchi. 1999. Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *J Cell Biol.* 144:575-86.
- Frasch, M. 1995. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature*. 374:464-7.
- Frasch, M. 1999. Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 9:522-9.
- Fritz, J.L., und M.F. VanBerkum. 2000. Calmodulin and son of sevenless dependent signaling pathways regulate midline crossing of axons in the *Drosophila* CNS. *Development*. 127:1991-2000.
- Frommer, G., G. Vorbrüggen, G. Pasca, H. Jäckle, und T. Volk. 1996. Epidermal egr-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance. *Embo J.* 15:1642-9.
- Fujise, M., S. Takeo, K. Kamimura, T. Matsuo, T. Aigaki, S. Izumi, und H. Nakato. 2003. Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development*. 130:1515-22.

- Golembo, M., T. Yarnitzky, T. Volk, und B.Z. Shilo. 1999. Vein expression is induced by the EGF receptor pathway to provide a positive feedback loop in patterning the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Genes Dev.* 13:158-62.
- Gotwals, P.J., S.E. Paine-Saunders, K.A. Stark, und R.O. Hynes. 1994. *Drosophila* integrins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol.* 6:734-9.
- Häcker, U., X. Lin, und N. Perrimon. 1997. The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development.* 124:3565-73.
- Haerry, T.E., T.R. Heslip, J.L. Marsh, und M.B. O'Connor. 1997. Defects in glucuronate biosynthesis disrupt Wingless signaling in *Drosophila*. *Development.* 124:3055-64.
- Han, C., T.Y. Belenkaya, M. Khodoun, M. Tauchi, und X. Lin. 2004a. Distinct and collaborative roles of *Drosophila* EXT family proteins in morphogen signalling and gradient formation. *Development.* 131:1563-75.
- Han, C., T.Y. Belenkaya, B. Wang, und X. Lin. 2004b. *Drosophila* glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development.* 131:601-11.
- Howitt, J.A., N.J. Clout, und E. Hohenester. 2004. Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. *Embo J.* 23:4406-12.
- Hsueh, Y.P., und M. Sheng. 1999. Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development. *J Neurosci.* 19:7415-25.
- Hsueh, Y.P., F.C. Yang, V. Kharazia, S. Naisbitt, A.R. Cohen, R.J. Weinberg, und M. Sheng. 1998. Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. *J Cell Biol.* 142:139-51.
- Hu, H. 2001. Cell-surface heparan sulfate is involved in the repulsive guidance activities of Slit2 protein. *Nat Neurosci.* 4:695-701.
- Inatani, M., F. Irie, A.S. Plump, M. Tessier-Lavigne, und Y. Yamaguchi. 2003. Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science.* 302:1044-6.

- Ishiguro, K., K. Kadomatsu, T. Kojima, H. Muramatsu, S. Tsuzuki, E. Nakamura, K. Kusugami, H. Saito, und T. Muramatsu. 2000. Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *J Biol Chem.* 275:5249-52.
- Johnson, K.G., A. Ghose, E. Epstein, J. Lincecum, M.B. O'Connor, und D. Van Vactor. 2004. Axonal heparan sulfate proteoglycans regulate the distribution and efficiency of the repellent slit during midline axon guidance. *Curr Biol.* 14:499-504.
- Kamimura, K., M. Fujise, F. Villa, S. Izumi, H. Habuchi, K. Kimata, und H. Nakato. 2001. *Drosophila* heparan sulfate 6-O-sulfotransferase (dHS6ST) gene. Structure, expression, and function in the formation of the tracheal system. *J Biol Chem.* 276:17014-21.
- Kamimura, K., J.M. Rhodes, R. Ueda, M. McNeely, D. Shukla, K. Kimata, P.G. Spear, N.W. Shworak, und H. Nakato. 2004. Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase. *J Cell Biol.* 166:1069-79.
- Keleman, K., S. Rajagopalan, D. Cleppien, D. Teis, K. Paiha, L.A. Huber, G.M. Technau, und B.J. Dickson. 2002. Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell.* 110:415-27.
- Keum, E., Y. Kim, J. Kim, S. Kwon, Y. Lim, I. Han, und E.S. Oh. 2004. Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C- $\alpha$ . *Biochem J.* 378:1007-14.
- Khare, N., und S. Baumgartner. 2000. Dally-like protein, a new *Drosophila* glypican with expression overlapping with wingless. *Mech Dev.* 99:199-202.
- Kidd, T., K.S. Bland, und C.S. Goodman. 1999. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell.* 96:785-94.
- Kidd, T., K. Brose, K.J. Mitchell, R.D. Fetter, M. Tessier-Lavigne, C.S. Goodman, und G. Tear. 1998. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell.* 92:205-15.
- Kirkpatrick, C.A., B.D. Dimitroff, J.M. Rawson, und S.B. Selleck. 2004. Spatial regulation of Wingless morphogen distribution and signaling by Dally-like protein. *Dev Cell.* 7:513-23.



- Knirr, S., N. Azpiazu, und M. Frasch. 1999. The role of the NK-homeobox gene *slouch* (S59) in somatic muscle patterning. *Development*. 126:4525-35.
- Kramer, K.L., J.E. Barnette, und H.J. Yost. 2002. PKCgamma regulates syndecan-2 inside-out signaling during xenopus left-right development. *Cell*. 111:981-90.
- Kramer, K.L., und H.J. Yost. 2002. Ectodermal syndecan-2 mediates left-right axis formation in migrating mesoderm as a cell-nonautonomous Vg1 cofactor. *Dev Cell*. 2:115-24.
- Kramer, S.G., T. Kidd, J.H. Simpson, und C.S. Goodman. 2001. Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science*. 292:737-40.
- Kreuger, J., L. Perez, A.J. Giraldez, und S.M. Cohen. 2004. Opposing activities of Dally-like glypican at high and low levels of Wingless morphogen activity. *Dev Cell*. 7:503-12.
- Leptin, M., und B. Grunewald. 1990. Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development*. 110:73-84.
- Li, J.P., F. Gong, K. El Darwish, M. Jalkanen, und U. Lindahl. 2001. Characterization of the D-glucuronyl C5-epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulfate. *J Biol Chem*. 276:20069-77.
- Li, J.P., F. Gong, A. Hagner-McWhirter, E. Forsberg, M. Abrink, R. Kisilevsky, X. Zhang, und U. Lindahl. 2003. Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *J Biol Chem*. 278:28363-6.
- Liang, Y., R.S. Annan, S.A. Carr, S. Popp, M. Mevissen, R.K. Margolis, und R.U. Margolis. 1999. Mammalian homologues of the *Drosophila* slit protein are ligands of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in brain. *J Biol Chem*. 274:17885-92.
- Lim, S.T., R.L. Longley, J.R. Couchman, und A. Woods. 2003. Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. *J Biol Chem*. 278:13795-802.
- Lin, D.M., und C.S. Goodman. 1994. Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron*. 13:507-23.

- Lin, X., E.M. Buff, N. Perrimon, und A.M. Michelson. 1999. Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development*. 126:3715-23.
- Lin, X., und N. Perrimon. 1999. Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature*. 400:281-4.
- Longley, R.L., A. Woods, A. Fleetwood, G.J. Cowling, J.T. Gallagher, und J.R. Couchman. 1999. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci*. 112 ( Pt 20):3421-31.
- Lopes, C., S. Gassanova, J.M. Delabar, und M. Rachidi. 2001. The CASK/Lin-2 *Drosophila* homologue, Camguk, could play a role in epithelial patterning and in neuronal targeting. *Biochem Biophys Res Commun*. 284:1004-10.
- Lord, P.C., M.H. Lin, K.H. Hales, und R.V. Storti. 1995. Normal expression and the effects of ectopic expression of the *Drosophila* muscle segment homeobox (msh) gene suggest a role in differentiation and patterning of embryonic muscles. *Dev Biol*. 171:627-40.
- Lum, L., S. Yao, B. Mozer, A. Rovescalli, D. Von Kessler, M. Nirenberg, und P.A. Beachy. 2003. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science*. 299:2039-45.
- Martin, J.R., und R. Ollo. 1996. A new *Drosophila* Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (Caki) is localized in the central nervous system and implicated in walking speed. *Embo J*. 15:1865-76.
- Menne, T.V., K. Luer, G.M. Technau, und C. Klämbt. 1997. CNS midline cells in *Drosophila* induce the differentiation of lateral neural cells. *Development*. 124:4949-58.
- Michelson, A.M., S.M. Abmayr, M. Bate, A.M. Arias, und T. Maniatis. 1990. Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes Dev*. 4:2086-97.
- Michelson, A.M., S. Gisselbrecht, Y. Zhou, K.H. Baek, und E.M. Buff. 1998. Dual functions of the heartless fibroblast growth factor receptor in development of the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Genet*. 22:212-29.
- Molitor, A. 2002. Isolierung und Charakterisierung des aeneas-Gens von *Drosophila melanogaster*. *Doktorarbeit*.

- Mushegian, A.R., J.R. Garey, J. Martin, und L.X. Liu. 1998. Large-scale taxonomic profiling of eukaryotic model organisms: a comparison of orthologous proteins encoded by the human, fly, nematode, and yeast genomes. *Genome Res.* 8:590-8.
- Naider, F., und J.M. Becker. 2004. The alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of peptide hormones and G protein-coupled receptors. *Peptides.* 25:1441-63.
- Nakato, H., T.A. Futch, und S.B. Selleck. 1995. The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of the nervous system in *Drosophila*. *Development.* 121:3687-702.
- Nguyen Ba-Charvet, K.T., K. Brose, L. Ma, K.H. Wang, V. Marillat, C. Sotelo, M. Tessier-Lavigne, und A. Chedotal. 2001. Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance. *J Neurosci.* 21:4281-9.
- Nose, A., T. Isshiki, und M. Takeichi. 1998. Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the msh homeobox gene. *Development.* 125:215-23.
- Oh, E.S., A. Woods, und J.R. Couchman. 1997a. Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J Biol Chem.* 272:11805-11.
- Oh, E.S., A. Woods, und J.R. Couchman. 1997b. Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem.* 272:8133-6.
- Park, Y., C. Rangel, M.M. Reynolds, M.C. Caldwell, M. Johns, M. Nayak, C.J. Welsh, S. McDermott, und S. Datta. 2003. *Drosophila* perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Dev Biol.* 253:247-57.
- Paterson, B.M., U. Walldorf, J. Eldridge, A. Dubendorfer, M. Frasch, und W.J. Gehring. 1991. The *Drosophila* homologue of vertebrate myogenic-determination genes encodes a transiently expressed nuclear protein marking primary myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:3782-6.
- Perrimon, N., und M. Bernfield. 2000. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature.* 404:725-8.
- Peter, A., P. Schottler, M. Werner, N. Beinert, G. Dowe, P. Burkert, F. Mourkioti, L. Dentzer, Y. He, P. Deak, P.V. Benos, M.K. Gatt, L. Murphy, D. Harris, B.

- Barrell, C. Ferraz, S. Vidal, C. Brun, J. Demaille, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, V. Lelaure, S. Mottier, F. Galibert, D. Borkova, B. Minana, F.C. Kafatos, S. Bolshakov, I. Siden-Kiamos, G. Papagiannakis, L. Spanos, C. Louis, E. Madueno, B. de Pablos, J. Modolell, A. Bucheton, D. Callister, L. Campbell, N.S. Henderson, P.J. McMillan, C. Salles, E. Tait, P. Valenti, R.D. Saunders, A. Billaud, L. Pachter, R. Klapper, W. Janning, D.M. Glover, M. Ashburner, H.J. Bellen, H. Jäckle, und U. Schäfer. 2002. Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep.* 3:34-8.
- Piepenburg, O., G. Vorbrüggen, und H. Jäckle. 2000. *Drosophila* segment borders result from unilateral repression of hedgehog activity by wingless signaling. *Mol Cell.* 6:203-9.
- Rajagopalan, S., E. Nicolas, V. Vivancos, J. Berger, und B.J. Dickson. 2000a. Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron.* 28:767-77.
- Rajagopalan, S., V. Vivancos, E. Nicolas, und B.J. Dickson. 2000b. Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell.* 103:1033-45.
- Ranganayakulu, G., R.A. Schulz, und E.N. Olson. 1996. Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol.* 176:143-8.
- Riechmann, V., U. Irion, R. Wilson, R. Grosskortenhaus, und M. Leptin. 1997. Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development.* 124:2915-22.
- Robertson, H.M., C.R. Preston, R.W. Phillis, D.M. Johnson-Schlitz, W.K. Benz, und W.R. Engels. 1988. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 118:461-70.
- Ronca, F., J.S. Andersen, V. Paech, und R.U. Margolis. 2001. Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. *J Biol Chem.* 276:29141-7.
- Rorth, P. 1996. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:12418-22.
- Rothberg, J.M., und S. Artavanis-Tsakonas. 1992. Modularity of the slit protein. Characterization of a conserved carboxy-terminal sequence in secreted

- proteins and a motif implicated in extracellular protein interactions. *J Mol Biol.* 227:367-70.
- Rothberg, J.M., D.A. Hartley, Z. Walther, und S. Artavanis-Tsakonas. 1988. slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell.* 55:1047-59.
- Rothberg, J.M., J.R. Jacobs, C.S. Goodman, und S. Artavanis-Tsakonas. 1990. slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev.* 4:2169-87.
- Ruiz Gomez, M., und M. Bate. 1997. Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development.* 124:4857-66.
- Ruiz-Gomez, M., N. Coutts, A. Price, M.V. Taylor, und M. Bate. 2000. *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell.* 102:189-98.
- Ruiz-Gomez, M., S. Romani, C. Hartmann, H. Jäckle, und M. Bate. 1997. Specific muscle identities are regulated by Krüppel during *Drosophila* embryogenesis. *Development.* 124:3407-14.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, und H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-91.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, und T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.* ISBN:0-87969-309-6.
- Schimmelpfeng, K., S. Gogel, und C. Klämbt. 2001. The function of leak and kuzbanian during growth cone and cell migration. *Mech Dev.* 106:25-36.
- Schnorrer, F., und B.J. Dickson. 2004. Muscle building; mechanisms of myotube guidance and attachment site selection. *Dev Cell.* 7:9-20.
- Seidler, D.G., E. Breuer, K.J. Grande-Allen, V.C. Hascall, und H. Kresse. 2002. Core protein dependence of epimerization of glucuronosyl residues in galactosaminoglycans. *J Biol Chem.* 277:42409-16.
- Selleck, S.B. 2000. Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet.* 16:206-12.

- Shworak, N.W., S. HajMohammadi, A.I. de Agostini, und R.D. Rosenberg. 2002. Mice deficient in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1: normal hemostasis with unexpected perinatal phenotypes. *Glycoconj J.* 19:355-61.
- Simpson, J.H., K.S. Bland, R.D. Fetter, und C.S. Goodman. 2000a. Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell.* 103:1019-32.
- Simpson, J.H., T. Kidd, K.S. Bland, und C.S. Goodman. 2000b. Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron.* 28:753-66.
- Spradling, A.C., und G.M. Rubin. 1982. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science.* 218:341-7.
- Spradling, A.C., D. Stern, A. Beaton, E.J. Rhem, T. Lavery, N. Mozden, S. Misra, und G.M. Rubin. 1999. The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics.* 153:135-77.
- Spradling, A.C., D.M. Stern, I. Kiss, J. Roote, T. Lavery, und G.M. Rubin. 1995. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10824-30.
- Spring, J., S.E. Paine-Saunders, R.O. Hynes, und M. Bernfield. 1994. *Drosophila* syndecan: conservation of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3334-8.
- Staehling-Hampton, K., F.M. Hoffmann, M.K. Baylies, E. Rushton, und M. Bate. 1994. dpp induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature.* 372:783-6.
- Stathopoulos, A., B. Tam, M. Ronshaugen, M. Frasch, und M. Levine. 2004. pyramus and thisbe: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 18:687-99.
- Staudt, N. 2002. Die Suche nach Faktoren des gerichteten Wachstums von Myotuben in der Embryogenese von *Drosophila* führt zu vielfältig, einem neuen Replikationsregulator. *Doktorarbeit.*
- Stepp, M.A., H.E. Gibson, P.H. Gala, D.D. Iglesia, A. Pajooresh-Ganji, S. Pal-Ghosh, M. Brown, C. Aquino, A.M. Schwartz, O. Goldberger, M.T. Hinkes, und M.

- Bernfield. 2002. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci.* 115:4517-31.
- Stock, J., und M. Surette. 1994. Bacterial chemotaxis. The motor connection. *Curr Biol.* 4:143-4.
- Swan, L.E., C. Wichmann, U. Prange, A. Schmid, M. Schmidt, T. Schwarz, E. Ponimaskin, F. Madeo, G. Vorbrüggen, und S.J. Sigrist. 2004. A glutamate receptor-interacting protein homolog organizes muscle guidance in *Drosophila*. *Genes Dev.* 18:223-37.
- Takei, Y., Y. Ozawa, M. Sato, A. Watanabe, und T. Tabata. 2004. Three *Drosophila* EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of heparan sulfate proteoglycans. *Development.* 131:73-82.
- Taylor, M.V. 2003. Muscle differentiation: signalling cell fusion. *Curr Biol.* 13:R964-6.
- The, I., Y. Bellaiche, und N. Perrimon. 1999. Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol Cell.* 4:633-9.
- Toyoda, H., A. Kinoshita-Toyoda, B. Fox, und S.B. Selleck. 2000a. Structural analysis of glycosaminoglycans in animals bearing mutations in sugarless, sulfateless, and tout-velu. *Drosophila* homologues of vertebrate genes encoding glycosaminoglycan biosynthetic enzymes. *J Biol Chem.* 275:21856-61.
- Toyoda, H., A. Kinoshita-Toyoda, und S.B. Selleck. 2000b. Structural analysis of glycosaminoglycans in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* and demonstration that tout-velu, a *Drosophila* gene related to EXT tumor suppressors, affects heparan sulfate in vivo. *J Biol Chem.* 275:2269-75.
- Tumova, S., A. Woods, und J.R. Couchman. 2000. Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences. *J Biol Chem.* 275:9410-7.
- VanBerkum, M.F., und C.S. Goodman. 1995. Targeted disruption of Ca(2+)-calmodulin signaling in *Drosophila* growth cones leads to stalls in axon extension and errors in axon guidance. *Neuron.* 14:43-56.
- Voigt, A., R. Pflanz, U. Schäfer, und H. Jäckle. 2002. Perlecan participates in proliferation activation of quiescent *Drosophila* neuroblasts. *Dev Dyn.* 224:403-12.

- Volk, T. 1999. Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. *Trends Genet.* 15:448-53.
- Vorbrüggen, G., und H. Jäckle. 1997. Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic stripe expression in the developing *Drosophila* epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:8606-11.
- Wang, K.H., K. Brose, D. Arnott, T. Kidd, C.S. Goodman, W. Henzel, und M. Tessier-Lavigne. 1999. Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. *Cell.* 96:771-84.
- Woods, A., und J.R. Couchman. 1994. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell.* 5:183-92.
- Yarnitzky, T., L. Min, und T. Volk. 1997. The *Drosophila* neuregulin homolog Vein mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells. *Genes Dev.* 11:2691-700.
- Yoshikawa, S., R.D. McKinnon, M. Kokel, und J.B. Thomas. 2003. Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature.* 422:583-8.
- Zhang, F., F. Ronca, R.J. Linhardt, und R.U. Margolis. 2004. Structural determinants of heparan sulfate interactions with Slit proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 317:352-7.



## 7 Lebenslauf

Patrick Steigemann

Geburtsdatum und-ort: 18.03.1975 in Lüneburg

Eltern: Patricia Steigemann geb. O´Gorman und Walter Steigemann

Nationalität: Deutsch

1981-1994 Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Lüneburg

1994 Abitur, Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule, Lüneburg

1994-1995 Zivildienst, Paritätischer Wohlfahrtsverband, Lüneburg

1995- 2001 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen

10/1997 Vordiplom

01/2000 Diplomprüfung  
(Mikrobiologie, Genetik, Chemie)

02/2000- 01/2001 Diplomarbeit  
Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abt. Molekulare  
Mikrobiologie und Genetik (Prof. Dr. G. H. Braus) der  
Georg-August-Universität Göttingen  
Thema: "Anaphase Promoting Complex" (APC) und  
Meiose in *Saccharomyces cerevisiae*

seit 03/2001 Promotion

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare  
Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. H. Jäcke/ Dr. G. Vorbrüggen),  
Göttingen

### **Publikationen außerhalb der Doktorarbeit:**

Bäumer, M., M. Künzler, P. Steigemann, G.H. Braus, und S. Irniger. 2000. Yeast Ran-binding protein Yrb1p is required for efficient proteolysis of cell cycle regulatory proteins Pds1p and Sic1p. *J Biol Chem.* 275:38929-37.

Bolte, M., P. Steigemann, G.H. Braus, und S. Irniger. 2002. Inhibition of APC-mediated proteolysis by the meiosis-specific protein kinase Ime2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4385-90.